

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

BACTÉRIE DU SOL UTILISANT FACILEMENT LE 2-3 BUTANEDIOL

par M. LEMOIGNE, H. GIRARD et G. JACOBELLI (*).

(*Institut Pasteur [Service des Fermentations]
et Institut national des Recherches agronomiques.*)

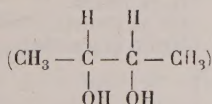
L'acétoïne et le 2-3 butanediol qui en dérive par réduction sont des produits fréquents et probablement constants du métabolisme glucidique chez les êtres vivants [1]. Ils se forment, notamment, très souvent en quantités importantes dans la décomposition des matières glucidiques dans le sol par processus microbien [2].

Bien que certains auteurs les considèrent comme des déchets inutilisables, nous avons montré, dans une revue d'ensemble et par des travaux personnels, qu'ils peuvent être détruits ou utilisés par les organismes qui les ont synthétisés ou par d'autres [3, 4].

D'autre part, nous avons vérifié l'intérêt écologique de la méthode du silico-gel de Winogradsky [5] en montrant que même dans le cas d'un métabolite aussi labile que le saccharose, elle permet de provoquer une pullulation bactérienne primaire, d'une espèce dominante et même, le plus souvent, pratiquement pure [6].

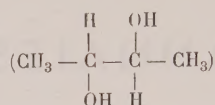
Aussi avons-nous appliqué cette technique au cas du 2-3 butanediol.

En fait, nous disposions du méso 2-3 butanediol inactif



(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 décembre 1951.

mélangé avec un peu d'isomère actif,



dextrogyre. Ce produit provenait de la N. V. Nederlandsche Gist en Spiritus Fabrik. Nous l'avons purifié par distillation.

La technique d'isolement a été celle du silico-gel de Wino-gradsky [5, 6]. Chaque boîte de Petri contenait 30 cm³ de gel, 0 ou 100 mg de NO₃Na et 450 mg de 2-3 butanediol.

On disposait à la surface du gel : 20 petits amas de la terre à étudier. Ces boîtes de Petri étaient mises dans des conserves avec de l'eau, pour éviter la dessiccation, et placées à l'étuve à 30°. L'incubation durait vingt-quatre ou quarante-huit heures.

Quand il n'y a pas d'azote dans le milieu, il n'y a pas de développement ou il y a apparition de colonies presque pures d'*Azotobacter* (surtout *Azotobacter chroococcum* [7]). Quand, au contraire, le milieu contient du nitrate de sodium, l'*Azotobacter* est en général éliminé, et autour des grains de terre on observe des pullulations microbiennes qui, tout moins au début, sont

TABLEAU 1. — Terres utilisées.

ORIGINE	NATURE	NATURE de la pullulation microbienne primaire
Versailles (S.-et-O.).	Limon de plateau.	Bactérie X.
Versailles (S.-et-O.).	Limon de plateau.	Bactérie X.
Auvernaux (S.-et-O.).	Terre argileuse.	Bacilles du groupe <i>subtilis</i> .
Limay (S.-et-O.).	Terre légère.	Rien Quelques moisissures.
Villebaude (S.-et-O.).	Terre légère.	Bacilles du groupe <i>subtilis</i>
Milliers (S.-et-M.).	Limon.	Bactérie X.
Agènes (S.-et-M.).	Terre argileuse.	Bactérie X.
Brie-Comte-Robert (S.-et-M.).	Limon de plateau.	Bactérie X.
Brie-Comte-Robert (S.-et-M.).	Limon de plateau.	Bactérie X.
Villers-Carbonnel (Somme).	Calcaire.	Bactérie X.
Villers-Carbonnel (Somme).	Limon.	Bactérie X.
Villers-Carbonnel (Somme).	Argile à silex.	Rien.
Villers-Carbonnel (Somme).	Terre humifère.	<i>Pseudomonas</i> .
Ferme des Anglais (Marne).		Bactérie X.
Blois (L.-et-C.).	Bon limon.	Bactérie X.
Che-nay (Sarthe).	Terre humifère.	Bacilles du groupe <i>subtilis</i>
Massif Central	Terre légère.	Bactérie X.
Quimper. Kerfily	Terre légère caillouteuse.	Bactérie X.
Quimper. Kernofer	Terre légère.	<i>Coccus</i> . Moisissures.
Quimper. Kernofer	Sol de prairie.	Bactérie X.
Quimper. Le Hen.	Jardin maraîcher.	Bactérie X.
Antibes 1		Bactérie X.
Antibes 2.		Bactérie X.
Antibes 3.		Bactérie X.
Antibes 4		Bactérie X.

formées d'une espèce dominante ou même souvent pratiquement pure.

Les résultats sont réunis dans le tableau I.

Le plus souvent, pour chaque terre, les essais ont été répétés. Ils ont toujours donné des résultats identiques.

Sur 25 terres étudiées :

2 n'ont donné aucune pullulation microbienne ;
23 ont donné des pullulations microbiennes constituées :
pour une, par un coccus non encore identifié,
pour une, par un *Pseudomonas fluorescens*,
pour 3, par un bacille du groupe du *Bacillus subtilis*,
et enfin pour 18, par une même bactérie que nous désignons provisoirement « bactérie X ».

Les colonies de cette bactérie, sur silico-gel nitraté contenant du 2-3 butanediol, se forment, en général, au bout de quarante-huit heures et autour de presque tous les grains de terre.

C'est dire que, quand elle existe, cette bactérie est abondante.

Son étude biochimique a été commencée par J.-P. Aubert [8], continuée par J.-P. Aubert et R. Gavard [9] et est poursuivie au laboratoire.

Dans ce travail, nous ne l'étudierons qu'au point de vue bactériologique.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

EXAMEN MICROSCOPIQUE. — Sans coloration : Cocci ou bâtonnets presque aussi larges que longs, d'environ 0,8 μ . Non mobiles. Pas de spores.

Isolés ou souvent par deux, quelquefois agglutinés, jamais en chaînes.

Après coloration : Gram-négatif. Se colorent bien uniformément par le Ziehl. Pas de cils par la méthode Casarès-Gil. Tout à fait exceptionnellement, dans certains milieux comme l'eau peptonée, quelques très rares formes en bâtonnets allongés.

ASPECT DES CULTURES. — *Bouillon Martin* : Trouble uniforme, pas de floculation en quarante-huit heures, dépôt pulvérulent. Ni voile, ni anneau.

Bouillon de haricot sucré : Trouble uniforme, pas de floculation en quarante-huit heures, dépôt pulvérulent. Anneau.

Gélatine en piqûre : A la surface, culture blanchâtre, un peu irisée. Pas de liquéfaction.

Gélose gélatine en boîte de Petri : Colonies rondes, bords nets, non envahissants, de 1 à 4 mm de diamètre, bombées, blanc chamois. Les colonies les plus petites sont fluorescentes à la lumière. Opaques. Crémeuses. Pas de liquéfaction.

Gélose de viande sur boîte de Petri : Comme dans gélose gélatine. Un peu plus petites, de 1 à 3 mm.

Gélose bouillon de haricots sur boîte de Petri : Colonies rondes, bombées, à bords nets, blanchâtres.

Gélose viande inclinée : Strie lisse, peu épaisse, à bords nets, blanc jaunâtre, opaque, crémeuse.

Sérum coagulé en strie : Strie mince, peu épaisse, verdâtre, lisse, opaque, à bords nets. Pas de liquéfaction.

Pomme de terre : Culture assez abondante, non caractéristique.

Lait tournesolé : Inchangé après huit jours.

Lait ordinaire : Après quinze jours, coagulation et acidification.

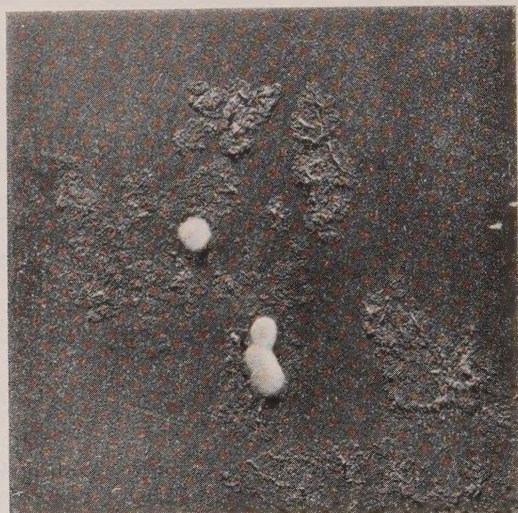


FIG. 1. — Gélose haricots sucrée. 5.250 D.

Lait gélosé en boîte de Petri : Même aspect que sur gélose viande. Pas de liquéfaction de la caséine après sept jours.

Urine : Culture assez abondante.

Formation d'indol : Négative.

Formation de nitrite : Négative avec Tronsdorf. Traces de nitrite avec le réactif de Griess.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES. — *Action de l'oxygène* : Cette bactérie est aérobie stricte. Elle ne donne pas de culture en profondeur ni dans le vide, alors que dans les milieux favorables elle se développe abondamment en surface ou dans un liquide fortement aéré par agitation ou barbotage d'air.

Réaction de la Catalase : Positive.

Alimentation azotée : Dans un milieu minéral, par exemple le milieu Grelet [46], en présence d'un substrat carboné favorable, comme par exemple le 2-3 butanediol, elle utilise l'azote nitrique, ammoniacal ou uréique. Dans ces conditions, elle peut faire la synthèse de tous les acides aminés et composés azotés qui lui sont nécessaires.

Son pouvoir protéolytique est faible, mais en surface, elle pousse, sans liquéfaction sur gélatine, sérum et lait gélosé. Elle se développe bien également sur peptone sans donner l'indol.

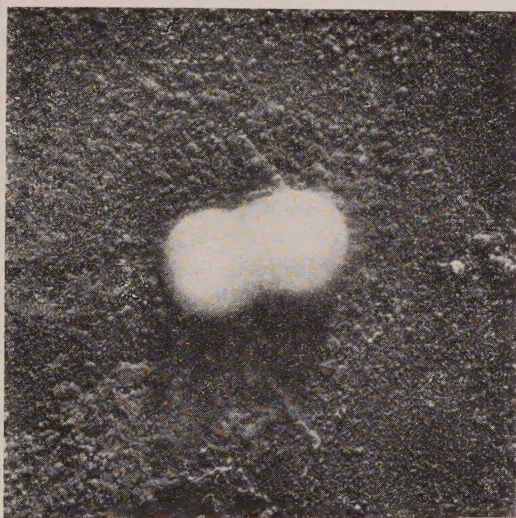


FIG. 2. — Gélose haricots sucrée. 45.750 D.

Alimentation carbonée : Elle peut utiliser les résidus carbonés provenant de la désamination des acides dérivés de la peptone et de la gélatine.

Comme nous l'avons dit, elle utilise remarquablement bien le 2-3 butanediol.

Elle utilise également le β -hydroxybutyrate de sodium.

Les résultats obtenus avec les sucres sont assez irréguliers et dépendent essentiellement des techniques employées. Nous reviendrons sur cette question dans un autre travail.

Ici nous ne donnerons que les résultats d'ordre bactériologique.

Dans 10 cm³ d'eau peptonée à 2 p. 100 avec 1 p. 100 de chaque substrat et du tournesol : avec le glucose, le galactose, le xylose et l'arabinose, il y a acidification et réduction partielle du colorant ; avec le lévulose, le saccharose, le lactose, le maltose, le

mannitol et le glycérol, il n'y a pas acidification. Il en est de même avec l'alcool éthylique (V gouttes dans 10 cm³).

En gélose inclinée au bouillon de viande avec 1 p. 100 de glucide et en présence de bleu de bromothymol, les résultats sont identiques à ceux que l'on obtient en eau peptonée.

Avec l'eau peptonée (0,5 p. 100) et substrat (2 p. 100) dans 2 cm³ de milieu en présence de rouge de phénol, l'aération est beaucoup plus intense. Les résultats sont identiques, sauf en ce qui concerne le lactose qui est acidifié et le maltose qui donne une réaction douteuse.

Alimentation vitaminique : En présence de 2-3 butanediol comme substrat, cette bactérie n'a besoin d'aucun facteur de croissance. Elle synthétise tous ceux qui lui sont nécessaires.

En présence de glucose, au contraire, des facteurs de croissance sont nécessaires. Nous reviendrons sur cette question.

Action des antibiotiques : Technique des disques de Chabbert [10]. Cette bactérie est pénicillino-résistante. Elle est sensible à la streptomycine, l'auroéomycine, la chloromycétine et la terramycine.

Action pathogène : Cette bactérie est légèrement pathogène pour la souris. Nous reprendrons cette question dans un prochain travail avec F. Boyer.

Nous avons recherché de quel groupe bactérien se rapprochait cette bactérie.

Une première difficulté tient à sa forme qui est quelquefois peu nette à l'examen microscopique, avec ou sans coloration.

On peut parfois hésiter entre une forme sphérique ou, au contraire, une forme bâtonnet très court. Dans une même préparation, on observait souvent l'une et l'autre.

L'emploi du microscope électronique permet de se faire une opinion. Nous remercions le Dr Lépine et M^{lle} Croissant, à qui nous devons les clichés qui sont présentés.

Le premier montre, au centre de la préparation, une forme isolée nettement sphérique. En bas, on voit, l'une près de l'autre, deux formes en bâtonnets, l'une très courte, l'autre près de deux fois plus longue que large. Au microscope ordinaire on pourrait conclure que ce sont des bâtonnets. Ici, on voit nettement que c'est une bactérie en voie de division constituée en fait de deux sphères accolées. C'est ce que montrent encore plus nettement les deuxième et troisième clichés où les cocci sont réunis deux par deux par des faces aplaties.

Cette bactérie est bien un *coccus*.

Par certains caractères elle se rapproche des organismes décrits sous le nom de *Micrococcus ureae*. Mais elle s'en distingue par son inactivité sur le saccharose, le mannitol et surtout par le fait que le Gram est toujours négatif. En outre, il faut reconnaître

que les descriptions de *Micrococcus ureae* sont très peu précises et qu'il serait tout à fait arbitraire d'identifier à cette espèce mal définie la bactérie que nous étudions ou toute autre que l'on rencontrerait dans le sol.

Si nous adoptons la classification de Prévot, cette bactérie étant un Coccus, Gram—, doit être rangée dans les Micrococcales, famille des *Neisseriaceæ* et comme elle est aérobie, elle appartiendrait au genre *Neisseria trevisan*. Aucune espèce du genre *Neisseria* ne peut lui être identifiée et nous avons pensé l'appeler *Neisseria winogradskyi*.

Si nous suivons la classification de Bergey, nous arrivons au même résultat.

Mais notre collègue Piéchaud, que nous remercions et qui a étudié diverses souches du genre *Moraxella* [13], nous a fait observer que les formes longues que l'on trouve exceptionnellement n'existent jamais chez les *Neisseria*, mais sont caractéristiques des *Moraxella*.

Si nous adoptons cette détermination, comme notre organisme pousse bien sur milieux synthétiques, nous devons le considérer comme un *Moraxella lwoffii*, sans pouvoir l'identifier complètement avec le *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* de Piéchaud, car certains caractères les distinguent, notamment la production d'uréase.

Toutefois, nous devons remarquer que dans notre milieu minéral au 2-3 butanediol, le *Neisseria intracellularis* pousse très bien, mieux que le *Moraxella lwoffii*. Nous reviendrons sur cette question dans un autre travail.

Mais nous remarquerons enfin que si l'on admet que cet organisme est bien un *Moraxella*, il faudrait modifier la définition de ce genre.

Nous rappelons cette définition d'après A. Audureau [14] : Le genre « *Moraxella* » (*Lwoff* 1939) est défini par les caractères suivants : Bactéries immobiles mesurant 0,5 à 1 μ de large sur 1,5 à 3 μ de long, présentant un groupement diplobacillaire caractéristique, donnant des chaînes dans les cultures, produisant souvent des formes d'involution longues, non capsulées, asporulées, en général Gram-négatif. Elles sont le plus souvent parasites de la muqueuse oculaire. Les espèces connues jusqu'ici ne font pas fermenter les glucides et ne produisent pas d'indol.

Déjà dans le cas de *Moraxella lwoffii brevis* [14] il y a beaucoup de cocci, mais il reste toujours au moins 1 p. 1 000 de formes allongées dans les conditions les moins favorables à leur développement. Or, dans le cas de notre organisme, il n'en est pas ainsi. Ce n'est pas un bâtonnet qui, dans des milieux spéciaux, présente quelques formes « coccus » ; ce sont des cocci qui, le plus souvent, sont parfaitement purs morphologiquement et qui,

dans certains milieux, présentent de très rares formes allongées, beaucoup moins de 1 p. 1 000.

Cet organisme peut donc être apparenté à deux groupes microbiens : *Neisseria* ou *Moraxella*, tous les deux en général parasites et le plus souvent pathogènes.

Ce fait est intéressant si l'on tient compte que notre bactérie est extrêmement commune dans le sol.

Cette bactérie a été isolée dans 18 terres sur 25 étudiées. Or, ces terres étaient d'origines géographiques différentes, avaient

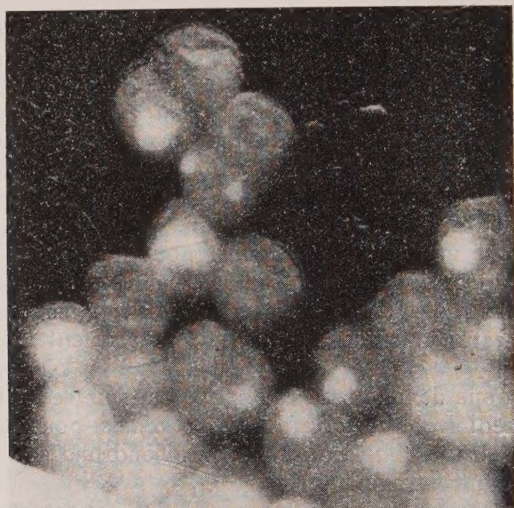


FIG. 3. — Milieu minéral liquide avec 2-3 butanediol. 45.750 D.

des propriétés physicochimiques également diverses et avaient été soumises à des modes de culture variés.

En outre, chaque fois qu'elle existait, presque tous les amas de terre étaient fertiles. C'est dire qu'elle est fréquente et abondante dans ces terres. On peut affirmer que cette bactérie du sol est banale.

Or, par les techniques ordinaires d'isolement, on pourrait sans doute la retrouver, mais on n'a jamais pu la mettre en évidence avec cette netteté et montrer son ubiquité.

Nous tirons, de ce fait, deux conclusions intéressantes la méthode Winogradsky du silico-gel.

Tout d'abord cette technique présente un grand intérêt pour les biochimistes qui veulent étudier le métabolisme d'un substrat déterminé. Elle permet, en effet, d'isoler rapidement, non pas toutes les bactéries actives sur ce substrat, mais à coup sûr, une

ou deux parmi les plus actives et le plus souvent à un état de pureté tel que leur isolement définitif est facile.

Comme nous l'avons montré [3, 4], beaucoup de bactéries attaquent le 2-3 butanediol, mais aucune, à notre connaissance, ne l'attaque avec cette activité.

Nous estimons cette technique bien supérieure aux méthodes classiques dites « d'enrichissement » et nous l'utilisons couramment au laboratoire [6, 11, 12].

L'autre conclusion concerne la valeur écologique de cette méthode. Nous l'avons déjà discutée dans un autre travail [6] et nous avons indiqué ce qu'elle peut présenter d'un peu artificiel. Mais néanmoins les résultats obtenus par Winogradsky et nous-mêmes conduisent à concevoir que les microorganismes ne se développent pas seulement au hasard de leur répartition dans le sol, mais aussi, et peut-être surtout, grâce à la présence de tel ou tel substrat. Ils l'attaquent avec une plus grande facilité que les autres microorganismes, ce qui leur permet de les supplanter tout au moins provisoirement. Le substrat transformé donne en effet d'autres produits qui provoquent d'autres pullulations [6].

Les quelques faits positifs que nous avons apportés ne suffisent pas à déterminer si cette succession de pullulations microbiennes dominantes existe réellement dans le sol lors de la destruction des matières organiques.

Pour vérifier si cette conception est exacte, il faudra un travail méticuleux et persévérant pour accumuler les observations obtenues avec les substrats purs. Il faudra ensuite étudier, au point de vue bactériologique et biochimique, les espèces microbiennes isolées, leurs antagonismes possibles. Enfin chercher comment les résultats obtenus pourront se concilier avec ce que l'on observe lors de la destruction des résidus végétaux et animaux dans les mêmes conditions expérimentales et enfin dans le sol lui-même.

Nous croyons que pour les recherches sur la flore zymogène du sol, la technique de Winogradsky, associée à l'étude biochimique des espèces isolées, peut être fructueuse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. LEMOIGNE et P. MONGUILLON. *C. R. Acad. Sci.*, 1930, **191**, 80.
- [2] M. LEMOIGNE. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, **10**, 862.
- [3] M. HOOREMAN, J.-P. AUBERT, M. LEMOIGNE et J. MILLET. *Ces Annales*, 1950, **78**, 497.
- [4] M. HOOREMAN, J.-P. AUBERT, M. LEMOIGNE et P. DUPUY. *Ces Annales*, 1950, **78**, 512.
- [5] S. WINOGRADSKY. *Ces Annales*, 1925, **39**, 299.
- [6] M. LEMOIGNE, H. GIRARD et G. JACOBELLI. *Ann. Agro.*, 1951, **2**, 89.

- [7] M. LEMOIGNE, H. GIRARD et G. JACOBELLI. *Ces Annales*, 1951, **80**, 428.
- [8] J.-P. AUBERT. *Thèse de Paris*, 1950.
- [9] J.-P. AUBERT et R. GAVARD. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1320.
- [10] Y. CHABBERT. *Ann. Biol. Clinique* (sous presse).
- [11] J. ROCHE, H. GIRARD, G. LACOMBE et M. MOURGUE. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1948, **2**, 414.
- [12] J. ROCHE, G. LACOMBE et H. GIRARD. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1950, **6**, 210.
- [13] D. et M. PIÉCHAUD. *Ces Annales*, 1951, **80**, 97.
- [14] A. AUDUREAU. *Ces Annales*, 1940, **64**, 126.
- [15] A. LWOFF. *Ces Annales*, 1939, **62**, 168.
- [16] A. GRELET. *Ces Annales*, 1946, **72**, 153.

SUR L'INSTABILITÉ DES CARACTÈRES D'UNE SOUCHE DE *SPOROVIBRIO*

par J. POCHON et M. A. CHALVIGNAC (*).

(Institut Pasteur. Laboratoire de Microbie technique.)

Les *Sporovibrio* réducteurs de sulfates sont actuellement classés en deux espèces principales : *Sp. desulfuricans* et *Sp. rubentschiki* ; le test essentiel de différenciation est constitué par l'utilisation de divers donateurs d'hydrogène (Baars) [1]. Cependant, on a depuis longtemps constaté des variations portant sur certains caractères, en particulier la tolérance aux températures élevées de culture et à la concentration du milieu en chlorure de sodium ; les souches présentant ces variations ont été élevées au rang d'espèce, ou tout au moins d'espèces adaptatives : *Sp. thermodesulfuricans* et *Sp. æstuarii*. De plus, Starkey [2] a décrit des modifications associées à ces adaptations, portant, en particulier, sur la morphologie.

Quoi qu'il en soit, on considère que l'utilisation des divers donateurs d'hydrogène constitue une base de détermination sûre et fixe des espèces ; c'est ainsi qu'une variété de *Sp. rubentschiki* a été individualisée sur le seul fait que les acétates n'étaient pas utilisés (var. *anomalus*).

Or, nous avons isolé une souche, entretenue avec passages fréquents sur milieux divers pendant un an et dont nous avons régulièrement suivi les caractères. Les faits observés nous incitent à penser que l'utilisation des divers donateurs d'hydrogène n'a peut-être pas toujours la stabilité qu'on lui accordait jusqu'ici.

ISOLEMENT. — Une terre de jardin (dite T. P., Institut Pasteur de Paris) a été ensemencée dans le milieu de Starkey [3] (C_2H_4 , 1 g ; PO_4H_2 , 0,5 ; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g ; SO_4Na_2 , 0,5 ; Cl_2Ca , 0,1 ; lactate de sodium, 3,5 g ; eau, 1 000 ; traces de sel de Möhr) à raison de 0,5 g par tube de 10 cm³. La culture apparaît (noircissement intense par formation de sulfure de fer) en quarante-huit heures ; au microscope on note un très grand

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 décembre 1951.

nombre de *Sporovibrio* morphologiquement typiques. A partir de cette culture liquide nous avons directement tenté l'isolement sur le même milieu solidifié par la gélose à 2 p. 100, réparti en tubes de 7 mm de diamètre sur une hauteur de 10 cm, avec la technique classique pour l'isolement des anaérobies, c'est-à-dire ensemencement en série d'une douzaine de tubes avec une pipette Pasteur fermée sans recharge entre les tubes. Une petite difficulté s'est présentée en ce sens que les premiers tubes contenaient un grand nombre de colonies, avec noircissement en masse du milieu et donc sans prélèvement possible de colonies séparées, alors que les tubes suivants n'en contenaient au contraire aucune. Pensant que notre milieu synthétique pouvait manquer de certaines substances (apportées dans les premiers tubes par l'ensemencement massif avec la culture mixte), nous avons, dans des essais ultérieurs, additionné, avant ensemencement, nos tubes gélosés de 1 cm³ de filtrat stérile sur bougie de la culture mixte en milieu liquide. De fait, dans ces conditions, nous avons obtenu une prolifération régulièrement décroissante dans la série de tubes gélosés avec colonies nettement séparées dans les derniers. Des colonies uniques ont ainsi pu être prélevées. Il semble donc bien que la microflore associée fasse la synthèse de facteurs de croissance favorisant les *Sporovibrio*. Ces faits s'expliquent assez bien à la lumière des travaux de Baumann et V. Denk [4] et de Senez [5] préconisant l'addition d'extraits de levure aux milieux de culture. Quoi qu'il en soit, à partir d'une colonie unique, repiquée sur milieu liquide, une culture pure a été obtenue.

CARACTÈRES DE LA SOUCHE A L'ISOLEMENT. — Les cultures sont réalisées sur milieu de Starkey au lactate de sodium à 30°.

Morphologie. — Elle est typique ; les germes sont mobiles, courts, sans formes filamenteuses ni chaînettes ; la proportion des cellules sporulées est élevée. Celles-ci résistent à un chauffage (en ampoules scellées) de cinq minutes à 85°. Elles sont tuées à 95°.

Nous avons essayé de mettre en évidence un appareil nucléaire dont le rapport avec la sporulation aurait été, pour les *Sporovibrio*, particulièrement intéressant. Malheureusement, il s'est avéré que la coloration d'un tel appareil était d'une très grande difficulté dans cette espèce : la technique de Piéchaud (azur I de méthylène sans hydrolyse préalable) a bien montré la présence de granules chromatiques, à la limite de la visibilité ; la technique de Robinow, utilisée telle quelle, a été décevante, ainsi que celle de Boivin et Tulasne (hydrolyse enzymatique par la ribonucléase suivie d'une coloration au Giemsa). En augmentant l'hydrolyse acide (CHI plus concentré, température plus élevée,

substitution de NO^3H à ClH), en la faisant précéder d'un traitement au sulfocyanate de potassium, nous avons également pu colorer au Giemsa des granules chromatiques, mais leur extrême petitesse, leur répartition irrégulière (très souvent monopolaire ou bipolaire), rendent tout essai de reconstitution d'un cycle impossible ou tout au moins par trop hypothétique. De plus, un phénomène, sur lequel nous reviendrons, la disparition des spores au cours des passages, nous a empêchés de préciser tout rapport entre ces granules chromatiques et la sporulation.

Physiologie. — Pour préciser les caractères de cette souche et surtout pour tenter de déterminer sa place dans la systématique, nous avons essayé tous les donateurs d'hydrogène indiqués par Baars, puisque telle est la base même de la classification. Les cultures ont été réalisées en milieu liquide, les différentes substances ajoutées à la concentration -M/30 ; trois passages successifs ont été réalisés sur chaque milieu afin d'éliminer toute trace de lactate apportée par le premier ensemencement. Au troisième passage, seuls étaient utilisables le méthanol, l'éthanol, l'acide pyruvique, l'acide tartrique.

Il apparaissait donc que la souche isolée ne pouvait être classée ni comme *Sp. desulfuricans*, ni comme *Sp. rubentschiki*, et qu'il s'agissait par conséquent d'une espèce nouvelle. Cependant, la suite de nos expériences nous fait douter qu'une telle affirmation soit licite.

PHÉNOMÈNES DE VARIATION OBSERVÉS SUR LA SOUCHE. — *Sporulation.* — Tout d'abord, au cours des passages, le nombre des germes sporulés a diminué progressivement, puis ceux-ci ont disparu en même temps que toute résistance des cultures au chauffage. Le fait n'est pas unique et Senez signale (communication orale) que presque toutes ses souches longuement entretenues sont asporulées. Le fait est intéressant car, dans le sol, la sporulation est de règle. L'entretien en culture pure et en milieu synthétique modifie profondément les caractères de ces germes et cela montre bien une fois de plus le danger, sur lequel a tant insisté S. Winogradsky (et sur lequel a récemment insisté à nouveau H. Winogradsky à propos des thiobactériales), de telles cultures qui finissent par transformer les microbes en types artificiels de laboratoire qui n'ont plus que de lointains rapports avec le type originel du sol, fait à l'origine de nombreuses erreurs d'interprétation.

Adaptation thermique. — L'isolement et les premières cultures ont été réalisés à 30°. Nous avons, en suivant la technique indiquée par Starkey, augmenté progressivement la température, de 3° en 3° : 33°, 36°, 39°, 41°, 45°, 48°, avec trois passages à chaque température. Toute prolifération est arrêtée au-dessus de

45°. La morphologie a été régulièrement suivie au microscope : elle s'est peu modifiée et, en particulier, les formes longues, filamenteuses observées par Starkey ne sont pas apparues.

Physiologie. — Le milieu d'entretien a été changé, le pyruvate de sodium substitué au lactate et, du fait de la disparition des spores, les passages ont dû être fréquents. La production de SH^2 , sur ce milieu, est moins importante que sur lactate, comme l'avait déjà noté Senez. Après quatre passages sur pyruvate, nous avons à nouveau cherché les donateurs d'hydrogène utilisables et la liste s'en est montrée profondément modifiée. Méthanol et éthanol ne permettent plus la culture, avec le lactate lui-même la phase de latence est prolongée et les cultures irrégulières.

Devant des faits aussi paradoxaux, nous avons pensé à la carence possible en facteurs de croissance et avons ajouté aux milieux de l'eau de levure (10 g de levure dans 100 cm^3 d'eau ; une heure à la température du laboratoire ; chauffage une heure à 115°, filtration) ou de l'extrait de levure Difco, aux concentrations indiquées par Senez (II gouttes d'une solution à 10 p. 100). Dans ces conditions, tous les donateurs d'hydrogène semblaient utilisables, mais le noircissement se produisait également dans les tubes témoins ne contenant que l'extrait de levure. La petite quantité de substances apportée par celui-ci était donc suffisante pour permettre la réduction des sulfates.

Devant de pareilles variations des caractères de notre souche, en particulier en ce qui concerne les donateurs d'hydrogène, il nous paraît aléatoire de chercher à la classer et non licite d'en faire une espèce nouvelle malgré l'utilisation, au départ, du méthanol et l'absence d'utilisation des sucres.

CONCLUSIONS.

La souche de *Sporovibrio* réductrice de sulfates que nous avons isolée du sol présentait, au début de son histoire au laboratoire, des caractères qui auraient pu, dans l'état actuel de la systématique, la faire classer comme une espèce nouvelle. Par entretien prolongé en culture pure dans des milieux synthétiques, ces caractères se sont modifiés de façon telle qu'il est permis de douter de la valeur absolue des tests utilisés jusqu'à ce jour pour la classification de ce groupe. Surtout il est montré, une fois de plus, l'inanité des extrapolations de constatations faites sur des souches entretenues en culture pure et en milieux synthétiques, à ce qui se passe dans le complexe du sol au sein de la microflore totale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAARS. *Thèse de Delft*, 1930.
- [2] STARKEY. *Arch. Mikrobiol.*, 1938, **9**, 268.
- [3] STARKEY. *J. Am. Water Works Assoc.*, 1948, **40**, 129.
- [4] BAUMANN et V. DENK. *Arch. Mikrobiol.*, 1950, **15**, 283.
- [5] J. SENEZ. *Ces Annales*, 1951, **80**, 395.

**ÉTUDE DES RÉACTIONS SÉROLOGIQUES ET SANGUINES
UTILISÉES POUR LE DIAGNOSTIC
DES PNEUMOPATHIES AIGÜES
DITES « PRIMITIVES ATYPIQUES » (P.A.P.)
OBSERVÉES EN FRANCE**

**(AGGLUTININE DES HÉMATIES A FROID ET DU STREPTOCOQUE M.G.
RÉACTIONS SÉROLOGIQUES DE LA SYPHILIS ET HÉMOGRAMMES)**

par R. SOHIER, M. MOREL, J. BUISSIÈRE, I. ESSER-TRIMBERGER
et J. JUILLARD (*).

*(Service des Contagieux de l'Hôpital Desgenettes
et Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon.)*

Bien que, dans divers pays, un certain nombre de documents aient déjà été publiés concernant la valeur des diverses méthodes biologiques proposées pour établir le diagnostic de l'affection décrite par les auteurs américains sous le nom de « primary atypical pneumonia », en France, il n'existe (du moins à notre connaissance) que très peu de travaux d'ensemble sur ce problème, mis à part les revues générales ou articles qui font état de faits recueillis à l'étranger. Ou bien des observations isolées indiquent qu'il a été fait usage de l'épreuve dite « des agglutinines à froid » pour confirmer un diagnostic, ou bien dans des études, d'ailleurs fort intéressantes, comme celles de A. Eyquem [1], de J. Marie, R. Marquézy, P. Debray, G. Cateigne, A. Eyquem et Cl. Hannoun [2], de G. Cateigne, A. Eyquem, Cl. Hannoun [3], de H. Boucher [4], les examens biologiques ne comportent qu'une partie des techniques proposées.

Nous avons pensé qu'il y avait quelque intérêt à rapporter les résultats des recherches que nous avons entreprises (1). On doit remarquer, en effet, que les méthodes pratiquement employées jusqu'à ce jour mettent en œuvre des réactions paraspécifiques, si l'on tient compte du fait qu'aucune d'entre elles ne paraît faire

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 janvier 1952.

(1) Réalisées grâce à une allocation de la *Caisse Nationale de Sécurité Sociale*.

intervenir l'agent causal de la maladie. Or, on sait que pour toute réaction de ce type (dont une, par exemple, utilise un germe isolé hors de notre pays : le streptocoque M. G.), il convient d'établir pour chaque contrée les résultats obtenus non seulement chez les malades, mais aussi chez un nombre suffisant de sujets considérés comme sains, et aussi chez ceux présentant des manifestations morbides pouvant être éventuellement confondues, du moins cliniquement, avec les pneumonies atypiques primitives (2).

Nous ne pourrions que résumer, dans la note qui va suivre, les faits que nous avons recueillis, nous réservant de reprendre une étude d'ensemble de la question. Ils concernent des P. A. P., des syndromes de congestion pulmonaire ou pleuro-pulmonaire non tuberculeux, des lésions tuberculeuses (3), des rhinopharyngites aiguës et catarrhes saisonniers, des affections diverses non respiratoires, enfin des sujets sains.

MÉTHODES UTILISÉES.

Les méthodes biologiques utilisées ont été les suivantes :

1° *Le titrage des agglutinines pour les hématies O à froid (agglutinines dites à tort « froides »).* — Sérum à expertiser (exsudé à la température du laboratoire et, si besoin, avec élution préalable à 37° des anticorps) réparti à raison de 0,5 ml par tube aux dilutions de 1/5 à 1/160 (et plus si nécessaire) ; mis en présence de 0,5 ml d'une suspension d'hématies humaines O (conservées en solution d'Alsever au maximum vingt et un jours, lavées trois fois, et mises en suspension à 0,2 p. 100). Contact une nuit au réfrigérateur 2°-4°. Lecture dès la sortie du réfrigérateur sur miroir concave. Il est tenu compte des agglutinations visibles grâce au grossissement du miroir. Taux de positivité admis $\geq 1/40$.

2° *Le titrage des agglutinines pour le streptocoque M. G.* — Souche de *Streptococcus* sp. M. G. (classée sous le n° 8037, remise par la National Collection of type cultures, Dr Cowan). Culture sur gélose

(2) Elles seront désignées dans ce qui va suivre et conformément à un usage déjà assez répandu, par les initiales P. A. P. Pour tout ce qui concerne cette affection, on pourra se reporter à l'article de B. Kreis in « Les ultra-virus des maladies humaines », C. Levaditi et P. Lépine. Maloine, édit., Paris, 1948.

(3) Nous adressons nos remerciements à nos collègues de l'Hôpital militaire *Desgenettes* qui ont bien voulu nous confier une partie des sérums étudiés ; le Médecin-Commandant Boucher et le Médecin-Lieutenant-Colonel Camelin. Des travaux d'ordre clinique ont déjà été publiés, en particulier par M. Boucher, travaux auxquels on se reportera utilement. Ils ont été d'ailleurs basés sur les réactions sérologiques que M. Lépine et nous-mêmes avons effectuées.

au sang puis, après vingt-quatre heures, sur milieu liquide (initialement bouillon ascite, puis bouillon placenta, et actuellement, milieu avec extrait Liebig, 5 g ; peptone Difco n° 2, 10 g ; glucose, 2 g ; NaCl, 5 g ; phosphate disodique, 2,5 g ; eau, 1 000 g). Ajusté à pH 7,4. Stérilisé quinze minutes à 120°. Centrifugation, lavage trois fois dans l'eau physiologique ; remis en suspension pour obtenir une concentration de 1 500 000 000 de germes au millilitre appréciée à l'échelle Mac Farlane. Sérum à expertiser réparti à raison de 0,25 ml par tube ; dilué du 1/5 au 1/80 (et plus si nécessaire), addition de 0,25 ml de la suspension de streptocoque, ce qui donne une dilution initiale au 1/10. Contact une nuit à 37°. Lecture le matin au sortir de l'étuve. Il n'est tenu compte que des agglutinations visibles à l'œil nu. Taux de positivité admis \geq à 1/40.

3° *Les réactions sérologiques de la syphilis.* — Deux types de méthodes ont été employés : d'une part, les réactions de fixation du complément Kolmer, Demanche typique avec ses deux antigènes dont un cholestérolé ; d'autre part, des réactions de floculation, Kahn standard, réaction du V. D. R. L., Meinicke. Tous les antigènes, à l'exception de celui de Meinicke, étaient ceux proposés par l'Institut Pasteur de Paris (4).

4° *Les réactions sérologiques pour les ultra-virus.* — La réaction de fixation du complément pour la grippe (5), les infections du groupe ornithose-psittacose et, pour quelques cas seulement, trop peu nombreux pour en tenir compte actuellement, la chorio-méningite lymphocytaire.

5° *Hémogramme.* — Numération des leucocytes et formule hémoleucocytaire à jeun, d'une part, au début de la maladie et, d'autre part, si possible, au décours de celle-ci.

RÉSULTATS OBTENUS.

I. P. A. P. — Nous avons considéré comme tels les états pulmonaires aigus comportant une scène fonctionnelle et physique caractéristique (angine prémonitoire avec ou sans conjonctivite discrète, toux rebelle, foyer pulmonaire latent cliniquement, mais décelé par radiographie, échec du traitement sulfamido-pénicillinique, action nette de l'auréomycine, convalescence traînante, avec asthénie parfois durable) et aussi les catarrhes saisonniers avec signes bronchiques physiques et fonctionnels rebelles, asthénie consécutive, résistance éventuelle à l'administration de sulfamides et de pénicilline, mais sans image radiologique.

(4) Nous tenons à remercier M. le Dr Laporte et M^{lle} Faure qui nous ont remis, en particulier, l'antigène du V. D. R. L.

(5) Nous remercions le Dr P. Lépine et M^{lle} V. Sautter qui ont bien voulu confirmer, par leur réaction d'inhibition de Hirst, les réactions de fixation du complément effectuées pour la grippe.

Soixante et onze cas de ce genre ont été retenus, au cours desquels nous avons observé :

Réactions sérologiques. — a) Cas avec agglutinines à froid positives (taux $\geq 1/40$) : 34 cas dont 15 cas où cette réaction était seule positive, 7 où l'on décelait également des agglutinines antistreptocoque M. G., 8 où l'on mettait également en évidence des réactions de la syphilis positives, 4 enfin, où les trois épreuves étaient positives [A. F., A. M. G., R. S. (6)]. Dans ces 34 cas, on trouve 3 sujets dont le sérum donnait une réaction sérologique de la grippe (R. de déviation du complément et de Hirst positives).

b) Cas avec agglutinines à froid négatives : 37 cas dont 12 cas où cette réaction était associée à des R. S. positives, 1 où il y avait également des A. M. G., 3 où l'on trouvait les deux dernières réactions (R. S. et A. M. G. positives). Il convient de noter que dans ce lot de 37 cas avec A. F. négatives, on trouve 3 sujets atteints de grippe à virus A (confirmé sérologiquement) et un malade qui avait une réaction sérologique positive pour l'ornithose.

Hémogramme. — Il n'a été pratiqué que pour 43 sujets. En ce qui concerne le taux des leucocytes, il a été trouvé dans 25 p. 100 des cas seulement une leucopénie ($< 6\,000$) et pour 25 p. 100 un nombre de leucocytes normal ou légèrement augmenté.

Par contre, chez 75 p. 100 des sujets, il y avait une lymphomonocytose (≥ 40 p. 100). La polynucléose n'a été notée que dans 3 p. 100 des cas.

On doit souligner l'évolution cyclique rencontrée souvent : leucopénie initiale, leucocytose et lymphomonocytose, puis à la phase terminale critique, éosinophilie.

Cas particulier des réactions sérologiques de la syphilis. — Nous avons décelé 27 positivités (soit 38 p. 100). Ce chiffre pourra paraître un peu faible, mais nous n'avons pu mettre en œuvre ces méthodes pour les 71 cas (47 sérums expertisés). Les résultats se répartissent comme suit : Kahn, 27 positifs. Dans 13 cas, cette réaction était associée à une autre : six fois à un Meinicke positif, cinq fois à une réaction de Demanche (antigène cholestérolé), une fois à un Kolmer, une fois enfin à ces trois réactions. Nous mettons à part un syndrome pulmonaire chez un syphilitique avéré pour lequel les réactions d'hémolyse et de floculation, y compris celle du V. D. R. L., étaient positives.

Nous croyons devoir attirer l'attention sur la réaction de flocu-

(6) Lire désormais pour A. F. = agglutinines à froid ; A. M. G. = agglutinines antistreptocoque M. G. ; R. S. = réactions sérologiques de la syphilis.

lation du V. D. R. L. qui a été constamment négative (27 cas), même lorsque les 4 autres étaient positives. Il convient de noter que, pour ce dernier cas, la réaction des A. F. et des A. M. G. étaient négatives.

Si l'on tente de définir la valeur des méthodes biologiques indirectes au cours des P. A. P. cliniquement typiques (avec les réserves qu'imposent les erreurs possibles sur ce point, pour une infection aux limites encore imprécises), on constate que, dans 48 p. 100 des cas, un taux significatif d'A. F. est décelé. Dans les 37 cas où la réaction des A. F. est négative, il en est 15 où les R. S. sont positives et 1 où l'on décèle un taux significatif d'A. M. G. Si l'on remarque que pour les 21 cas à réactions sérologiques négatives, on en compte 7 qui ont une lymphomonocytose nette, on est conduit à admettre que dans 80 p. 100 des cas, en combinant les données de la clinique, de la sérologie et de l'hématologie, on arrive à un diagnostic de P. A. P. On ne doit pas méconnaître, en outre, les autres infections virales (3 cas de grippe et 1 cas d'oreillons) pour lesquelles le diagnostic de P. A. P. avait été cliniquement porté.

On constatera, par ailleurs, que nous n'avons observé que 3 sujets dont le sérum contenait un taux significatif d'A. F. positives et donnait des réactions positives pour la grippe.

Enfin, il convient de préciser que si le nombre de réactions positives pour les A. M. G. est relativement faible (15 sur 71), en aucun cas les sujets ayant fourni le sérum n'ont été atteints de formes graves.

II. SYNDROMES DITS DE CONGESTION PULMONAIRE OU PLEURO-PULMONAIRE. — Il a été procédé à l'étude de 51 cas. Pour 5 d'entre eux, il s'agissait d'infiltrats labiles dont 2 types Löffler avec éosinophilie et ascaridiose. La réaction des A. F. était négative. Elle l'était également pour 2 autres malades (avec pour l'un une réaction positive pour la grippe, pour l'autre une réaction positive pour l'ornithose). Parmi les cas restants, 4 comportaient une réaction des A. F. positive. La recherche des A. M. G. effectuée pour 34 malades a été négative.

III. TUBERCULOSE PULMONAIRE. — Les recherches ont été effectuées pour 28 malades. Pour 3 d'entre eux seulement, la réaction des A. F. était positive (une primo-infection et, pour deux tuberculoses chroniques tertiaires, deux poussées fébriles de nature, l'une indéterminée, l'autre grippale sérologiquement démontrée).

IV. CATARRHES SAISONNIERS (RHINO-TRACHÉO-BRONCHITES AIGÜES). — Pour aucun des 26 sujets dont le sérum a été expertisé, on ne trouve de réaction positive des A. F. La réaction des A. M. G.

pratiquée dans 12 cas a été une seule fois positive. On relève aussi une réaction de Meinicke fortement positive de façon transitoire.

V. PNEUMOPATHIES CHRONIQUES DIVERSES. — Il s'agissait de cancers, bronchiectasies, suppurations pulmonaires ou pleurales diverses. Sur 24 cas étudiés, on compte 2 réactions des A. F. positives (une maladie de Besnier-Boeck-Schaumann et une pneumopathie post-opératoire qui ressortissait peut-être à la P. A. P.). Sur 20 recherches des A. M. G., 20 résultats négatifs.

VI. SUJETS TÉMOINS. — a) *Affections diverses non pulmonaires.* — Dans ce lot de 13 malades, on compte 2 réactions des A. F. positives (1 ictère viral à évolution prolongée et 1 réticulo-endothéliose type sarcome d'Ewing).

b) *Sujets apparemment normaux.* — Ce sont 297 étudiants en médecine de l'Ecole du Service de Santé militaire qui avaient été examinés cliniquement et radiologiquement avant l'examen sérologique.

En ce qui concerne la réaction des A. F., on compte 3 réactions positives ($\geq 1/40$), sans que l'on ait pu déceler dans leurs antécédents des signes de P. A. P. Pour la réaction des A. M. G., 15 réactions positives. On doit noter que, chez les 3 sujets dont le sérum contenait des A. F., on ne trouvait pas d'A. M. G. à un titre significatif.

On pourrait donc admettre que chez le sujet sain, l'association A. F. + A. M. G. n'a jamais été rencontrée.

On ne doit pas méconnaître, pour les autres résultats positifs dissociés, qu'il s'agissait d'étudiants en médecine ayant pu présenter des infections inapparentes.

EN CONCLUSION. — Les méthodes biologiques habituellement utilisées (hormis la recherche des agglutinines T) pour établir le diagnostic de la « pneumonie primitive atypique » ont été mises en œuvre sur 510 sérums, provenant de sujets atteints de P. A. P. (71), de congestions pulmonaires ou pleuropulmonaires non classables sous la précédente rubrique (51), de tuberculose (28), de catarrhe saisonnier (26), de pneumopathies chroniques diverses (24), d'affections non pulmonaires (13), enfin de sujets sains (297).

L'emploi simultané de toutes ces réactions est utile pour établir ou confirmer le diagnostic de P. A. P., car elles peuvent se compléter. Les plus fréquemment positives sont, par ordre d'importance, celles des agglutinines pour les hématies à froid (A. F. 48 p. 100), les agglutinines antistreptocoque M. G. (A. M. G. 21,1 p. 100). Si certains auteurs (G. Cateigne, A. Eyquem, Cl. Hannoun) [*loc. cit.*] considèrent comme sans intérêt la

recherche des A. M. G., parce qu'elle ne serait positive que dans 20 p. 100 des cas moyens ou légers (et on remarquera que nous avons trouvé en France à peu près le même taux [21,1 p. 100] que dans les pays anglo-saxons), on peut reconnaître qu'elle peut avoir un intérêt pour confirmer un diagnostic établi par d'autres techniques ou même en dehors de celles-ci (1,4 p. 100 dans notre série).

La constatation d'une lymphomonocytose (75 p. 100 des cas) a une certaine valeur, réserve étant faite du nombre d'infections, notamment virales, s'accompagnant d'une telle modification sanguine. On doit noter, en ce qui concerne les réactions de la syphilis, que si une ou plusieurs d'entre elles sont parfois positives, la réaction du V. D. R. L. est apparue, du moins dans les cas étudiés, constamment négative.

On peut trouver dans les affections pulmonaires ne paraissant pas relever de la P. A. P., quelques réactions positives (A. F. 7,7 p. 100) alors que d'autres ont été constamment négatives (A. M. G.).

Chez les sujets sains également, on obtient quelques positivités (1,01 p. 100 pour la réaction des A. F. et 5,05 p. 100 pour celle des A. M. G.). Mais on peut admettre l'existence d'infections inapparentes, compte tenu du fait que la plupart des sujets sains dont le sérum a été étudié étaient des étudiants en médecine.

Dans 3 cas sur 38 (8,8 p. 100) où le diagnostic de P. A. P. avait été porté en raison de la présence d'un taux significatif d'A. F., il s'agissait de grippe, à en juger par la positivité des réactions spécifiques de cette infection.

RÉSUMÉ.

Les méthodes biologiques proposées pour établir le diagnostic de la pneumonie primitive atypique (mise à part la recherche des agglutinines T) ont été mises en œuvre sur 510 sérums, dans le but d'étudier en France, chez les malades et les sujets normaux, certaines techniques qui ne semblent pas avoir été systématiquement employées jusqu'ici. Les taux de positivité trouvés pour cette série sont très voisins de ceux indiqués dans les diverses études d'ensemble. Il y a intérêt à utiliser simultanément le plus grand nombre possible de réactions, car elles peuvent se compléter utilement bien qu'à des degrés divers.

L'attention est attirée, d'une part, sur le petit nombre de positivité de la réaction des agglutinines à froid au cours de pneumopathies ayant certains caractères cliniques et radiologiques des P. A. P., mais relevant de la grippe; d'autre part, sur l'intérêt de la négativité de la réaction du V. D. R. L. dans les cas où d'autres réactions de la syphilis sont positives.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. EYQUEM. *Sem. des Hôpitaux*, 1950, **26**, 2523.
- [2] J. MARIE et coll. *Ibid.*, 1950, **26**, 2531.
- [3] G. CATEIGNE et coll. *La Presse Méd.*, 1950 **58**, 438.
- [4] H. BOUCHER. *Lyon Méd.*, 1950, n° 31, 66.

ERRATUM

Ces *Annales*, 1952, **82**, Mémoire P. Villemin et F. Boyer, p. 322, 13^e ligne :

Au lieu de : pendant plusieurs jours *suivants*, il faut lire : pendant plusieurs jours *consécutifs*.

Même page, 27^e ligne :

Au lieu de : dilution finale à $2 \times 10^{-10^4}$, il faut lire : dilution finale à 2×10^{-4} .

QUELQUES CONDITIONS D'APPARITION ET DE NON-APPARITION DU PHÉNOMÈNE HÉMORRAGIQUE DE SANARELLI-SHWARTZMAN

par A. ALECHINSKY.

(Laboratoire de Bactériologie de l'Université de Bruxelles.)

On sait que le phénomène de Sanarelli [1] et celui de Shwartzman [2] s'obtiennent à l'aide de produits élaborés par certaines bactéries. La substance active se trouve dans les cultures et dans les filtrats de ces cultures. La réaction hémorragique qui caractérise le phénomène apparaît à la suite de deux injections successives. Une première qui prépare le terrain et que l'on appelle injection « préparante », et une deuxième qui déclenche le phénomène, c'est l'injection « déchaînante ». Il importe de laisser entre les deux injections un certain intervalle de temps ; l'optimum est de vingt-quatre heures. Les animaux qui se prêtent bien à ces expériences sont les lapins et les cobayes.

Alors que pour le phénomène de Sanarelli, les deux injections, préparante et déchaînante, doivent être pratiquées par voie intraveineuse, par contre, pour le phénomène de Shwartzman, la préparante est intradermique et seule l'injection déchaînante est intraveineuse. De plus, en observant la technique de Sanarelli, la réaction hémorragique apparaît dans un ou plusieurs viscères, sans qu'on puisse prévoir les lieux d'apparition. Par la technique de Shwartzman, la localisation de la réaction est connue d'avance, puisqu'elle se développe à la surface cutanée là où fut pratiquée l'injection préparante. Ces lésions hémorragiques, cutanées et viscérales, apparaissent habituellement trois ou quatre heures après l'injection déchaînante. Elles se manifestent par des éclatements des vaisseaux capillaires disséminés d'abord mais qui, en se multipliant, forment rapidement des taches purpuriques qui finissent par confluer en de vastes plages hémorragiques. Dans le cas de Shwartzman, l'animal survit souvent, même quand l'étendue de la lésion est considérable. Dans le cas de Sanarelli, le syndrome hémorragique tue très fréquemment l'animal et, suivant l'intensité et l'importance de la localisation du processus, la mort survient quelquefois très rapidement, parfois après

quelques heures, parfois après un ou deux jours et même davantage. A l'autopsie, on trouve des pétéchies et des plaques hémorragiques disséminées dans le poumon, les reins, l'intestin, l'épiploon, le tractus génital, le mésentère, etc. Mais si la lésion est légère, superficielle, de moindre importance anatomique, l'animal survit et guérit parfaitement. Rappelons que seuls sont actifs les produits de certaines souches microbiennes tels que les germes des groupes Coli-typhiques et para-typhiques, les méningocoques, gonocoques, pneumocoques, certains streptocoques, staphylocoques, et d'autres encore. Le phénomène est donc spécifiquement microbien ; nous voulons dire par là qu'il exige pour son obtention une substance provenant d'un matériel microbien. Mais au point de vue immunologique, le phénomène n'est pas strictement spécifique en ce sens que les deux injections ne doivent pas nécessairement être pratiquées avec la même substance. On peut utiliser pour l'une ou l'autre injection le produit provenant de germes différents ; par exemple, si l'on emploie pour l'injection préparante un filtrat de culture typhique, on peut utiliser pour l'injection déchaînante soit le même filtrat ou un filtrat de *E. coli*, de méningocoque, du *proteus*, du vibron du choléra, etc.

Sanarelli, pour provoquer sa réaction, avait utilisé comme injection préparante la culture telle quelle, et comme injection déchaînante, des filtrats de cultures. Shwartzman, lui, n'emploie que des filtrats. Gratia et Linz ont montré que la réaction de Sanarelli est réalisable comme celle de Shwartzman, en utilisant des filtrats pour les deux injections. Shwartzman prépare ses filtrats de deux façons : il filtre sur bougie ou bien des cultures en bouillon ordinaire de six jours, ou bien des émulsions en eau physiologique de vingt-quatre heures sur gélose. Récemment l'expérience nous a montré que les filtrats des cultures en bouillon nutritif pauvre, notamment le bouillon « Difco » (« Bacto nutrient broth ») donnent un meilleur rendement en substance active. Ce sont eux que nous avons utilisés pour nos recherches.

L'analogie de ces réactions (Sanarelli et Shwartzman) n'a pas manqué d'impressionner les chercheurs. Leur identité a été démontrée par Gratia et Linz [3], par Paul Bordet [4], par Alechinsky [5]. *A priori* on pouvait penser qu'en préparant un animal simultanément par une double injection, une dans la peau et une dans la veine, l'injection déchaînante pratiquée vingt-quatre heures après provoquerait des réactions hémorragiques tant dans la peau que dans les viscères. En théorie, rien ne s'oppose à la production d'un double phénomène de Sanarelli Shwartzman.

Or, chose surprenante, il n'en est rien. Lorsque deux injections préparantes, l'une dans la peau, l'autre dans la veine, sont

pratiquées simultanément, aucune manifestation hémorragique ne se développe ni dans la peau, ni dans les viscères.

Voici une expérience type ; des photographies illustrent remarquablement ce phénomène.

A 3 lapins adultes A, B et C, les injections préparantes sont administrées de la façon suivante : le lapin A reçoit 0,5 cm³ de filtrat d'*Escherichia coli* dans la peau du flanc, injection préparante pour un phénomène de Shwartzman. Le lapin B reçoit 1 cm³ du filtrat d'*E. coli* dans la veine marginale de l'oreille, injection préparante pour phénomène de Sanarelli. Le lapin C reçoit simultanément 0,5 cm³ d'*E. coli* dans la peau du flanc et 1 cm³ dans la veine marginale de l'oreille en vue d'obtenir une double réaction de Shwartzman et de Sanarelli. Après un intervalle de vingt-quatre heures, on pratique l'injection déchainante et chacun de ces animaux en expérience reçoit 2 cm³ de filtrat d'*E. coli* dans la veine marginale de l'oreille.

Résultat. — Quatre heures après l'injection déchainante, le



FIG. 1. — Lapin A : La région cutanée vingt-quatre heures après l'injection préparante. On remarque qu'elle est épaisse, infiltrée et érythémateuse.

lapin A est déjà porteur d'une réaction de Shwartzman. Le lapin B est mort après neuf heures et l'autopsie découvre des réactions de Sanarelli dans le poumon, les reins, l'épiploon, l'intestin et des caillots de sang dans la cavité péritonéale. Quant au lapin C, observé pendant vingt-quatre heures, il n'a présenté aucune réaction hémorragique cutanée. Il est sacrifié et l'autopsie ne montre aucune lésion viscérale.

Les différentes phases de ces réactions sont clairement lisibles sur ces photographies.

Cette absence de réaction a déjà été signalée par Gross [6] d'une part et, d'autre part, par Ogata [7], au cours de leurs études sur le phénomène de Shwartzman. Mais aucun de ces auteurs n'a soumis ce fait à l'analyse expérimentale afin d'en étudier le mécanisme.

Pour comprendre le mécanisme de ce phénomène en apparence

paradoxal, on peut imaginer diverses hypothèses. On peut, par exemple, se demander si la double injection préparante n'a pas entraîné un accroissement de la perméabilité vasculaire. On peut, dans le même ordre d'idées, se demander si la perméabilité vascu-



FIG. 2. — Lapin B : Le lapin, vingt-quatre heures après l'injection préparante intraveineuse, ne présente rien de particulier si ce n'est un peu de sensibilité abdominale.



FIG. 3. — Lapin C : La région cutanée vingt-quatre heures après l'injection préparante double faite simultanément, une dans la peau et une dans la veine. Contrairement à ce qui existe chez le lapin A, elle est souple, lisse, sans la moindre infiltration et sans érythème.

laire, au lieu de s'accroître, n'est pas au contraire atténuée. On peut enfin penser aussi à l'intervention, au cours de ces injections, d'un facteur de diffusion de Duran-Reynals auquel Ogata a déjà fait allusion.

Envisageons tout d'abord la première hypothèse. Supposons un instant que l'injection préparante intraveineuse et l'injection préparante intradermique pratiquées en même temps ont entraîné



FIG. 4. — Lapin A : Une vaste plaque hémorragique est apparue quatre heures après l'injection déchainante.



FIG. 5. — Lapin B : Les viscères du lapin mort neuf heures après l'injection déchainante. On distingue clairement des lésions hémorragiques dans le poumon, les reins, l'épiploon, l'intestin et des caillots de sang dans la cavité péritonéale.

un accroissement de la perméabilité vasculaire. On pourrait imaginer que le filtrat préparant cutané est résorbé rapidement dans la circulation générale et par conséquent n'a pas le temps de se fixer dans le tissu. De même, le filtrat introduit par la voie veineuse diffuse très rapidement dans l'économie sans pouvoir

se fixer au niveau de l'endothélium des capillaires en concentration suffisante pour créer l'état de préparation. D'où l'inefficacité de l'injection déchainante aussi bien à la peau que dans les viscères. Si on accepte cette hypothèse, on doit pouvoir neutraliser la phase de préparation d'un Schwartzman ou d'un Sanarelli classique en augmentant la perméabilité vasculaire à l'aide d'un agent perméabilisant connu tel que l'histamine, par exemple.

On sait que la principale propriété de l'histamine ou B-imidazol-éthylamine, injectée dans le derme, est de dilater les petits vaisseaux : capillaires, artérioles et vénules ; il en résulte une perméabilité locale accrue. Si on l'introduit directement dans la

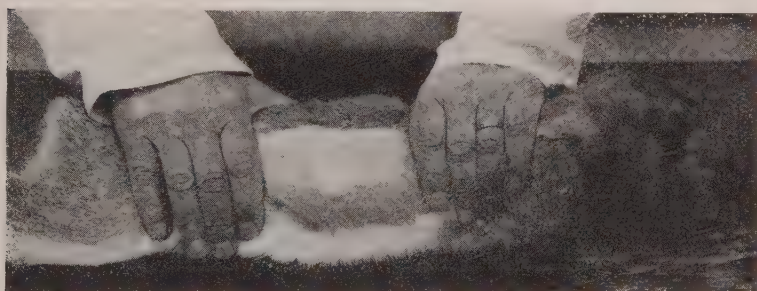


FIG. 6. — Lapin C : La région préparée vingt-quatre heures après l'injection déchainante est restée sans changement.

circulation sanguine, c'est sur l'ensemble de cette circulation que l'on déterminera une plus grande perméabilité. Cette action physiopathologique de l'histamine nous a servi pour la vérification de notre première hypothèse.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

L'*Escherichia coli* ϕ est ensemencé dans un ballon à large surface contenant 200 cm³ de bouillon Difco [8] et laissé à l'étuve pendant six jours à 37°. La culture est ensuite centrifugée et le liquide surnageant est filtré sur bougie Chamberland L₃. On obtient ainsi un filtrat clair légèrement jaunâtre très actif. D'autre part, on prépare une solution physiologique de chlorhydrate d'histamine à 1 p. 1 000.

Les lapins ont été pris par groupes, sans qu'il soit tenu compte du sexe ou de la couleur du pelage. Le poids des animaux varie de 1 500 à 2 000 g. Les injections préparantes cutanées ont été effectuées toujours dans le flanc. Les injections préparantes intra-

veineuses ont été administrées dans la veine marginale de l'oreille et les injections déchainantes par la même voie. Pour toutes ces injections, le filtrat a été accompagné d'une dose d'histamine et administré, suivant le cas, séparément ou en mélange. Les résultats de la réaction sont lus dans l'espace des vingt-quatre heures qui suivent les injections déchainantes.

EXPÉRIENCE I. — Un lot de 18 lapins est réparti en trois séries égales. A 6 lapins de la série 1, nous injectons dans la peau un mélange composé de $0,5\text{ cm}^3$ de filtrat + $0,5\text{ cm}^3$ d'histamine et en même temps, dans la veine, 1 cm^3 de filtrat pur. A 6 lapins de la série 2, nous injectons dans la peau $0,5\text{ cm}^3$ de filtrat pur et en même temps, dans la veine, un mélange composé de 1 cm^3 de filtrat + 1 cm^3 d'histamine. A 6 lapins de la série 3, nous injectons dans la peau un mélange composé de $0,5\text{ cm}^3$ de filtrat + $0,5\text{ cm}^3$ d'histamine et en même temps, dans la veine, un mélange contenant 1 cm^3 de filtrat + 1 cm^3 d'histamine. Après un intervalle de vingt-quatre heures, nous administrons les injections déchainantes : 4 lapins de chaque série reçoivent 2 cm^3 de filtrat pur et 2 lapins un mélange contenant 2 cm^3 de filtrat + 1 cm^3 d'histamine.

Résultats. — Aucun de ces animaux n'a présenté de réaction ni de Shwartzman ni de Sanarelli. L'autopsie, pratiquée vingt-quatre heures après l'injection déchainante, est négative.

EXPÉRIENCE II. — Un lot de 20 lapins répartis par 5, en quatre séries. La série 1 reçoit dans la peau $0,5\text{ cm}^3$ de filtrat et en même temps, dans la veine, 1 cm^3 d'histamine. La série 2 reçoit dans la peau un mélange de $0,5\text{ cm}^3$ de filtrat + $0,5\text{ cm}^3$ d'histamine et en même temps, dans la veine, rien que 1 cm^3 d'histamine. La série 3 reçoit dans la peau un mélange de $0,5\text{ cm}^3$ de filtrat + $0,5\text{ cm}^3$ d'histamine et rien dans la veine. La série 4 reçoit dans la veine un mélange de 1 cm^3 de filtrat + 1 cm^3 d'histamine et rien dans la peau. Après un intervalle de vingt-quatre heures, nous pratiquons les injections déchainantes. Trois lapins de chaque série reçoivent 2 cm^3 de filtrat pur et 2 lapins un mélange de 2 cm^3 de filtrat + 1 cm^3 d'histamine. Dans les heures qui ont suivi ces injections déchainantes, tous les animaux ont présenté des réactions hémorragiques de Sanarelli et de Shwartzman. Les lapins des séries 1, 2 et 3 avaient un Shwartzman fortement positif. Des lapins de la série 4, 3 sont morts, et l'autopsie décèle des réactions de Sanarelli dans plusieurs viscères. Les 2 lapins restants sont sacrifiés et, à l'autopsie, l'un présentait des pétéchies hémorragiques dans le poumon et l'épiploon et l'autre des points purpuriques du gros intestin et des reins.

Ces deux cycles d'expériences nous donnent l'impression que l'augmentation de la perméabilité vasculaire par l'histamine ne semble pas jouer un rôle important dans le déterminisme de la non-apparition du phénomène, puisque d'une part (expérience I), l'action de l'histamine ne modifie pas les résultats de l'expé-

rience avec double préparation, d'autre part (expérience II), l'augmentation de la perméabilité qu'elle détermine n'entrave nullement l'apparition du phénomène de Sanarelli et de Shwartzman avec leur aspect classique.

Ceci étant acquis, il nous reste à aborder l'autre côté de la question en admettant donc l'hypothèse non pas d'une augmentation, mais au contraire d'une diminution ou fléchissement de la perméabilité vasculaire.

Dans ces conditions le filtrat préparant se fixerait bien, sans doute, mais le filtrat déchaînant, faute de cette perméabilité accrue, n'arriverait peut-être pas à une concentration suffisante pour déclencher la réaction. On pourrait donc prévoir ici également qu'en empêchant l'accroissement de la perméabilité vasculaire, l'injection déchaînante resterait sans effet dans un Shwartzman ou dans un Sanarelli préparé classiquement.

Dans ce but, nous avons cru intéressant de joindre aux injections du filtrat un antihistaminique de synthèse, notamment le phénergan. Ce corps a été fort étudié par B. N. Halpern [9] qui nous a fait connaître ses remarquables effets sur l'empêchement des réactions œdémateuses expérimentales. Dans ce domaine, le phénergan est précisément apparu, à la lumière des recherches de cet auteur, comme étant le corps le plus actif.

Nous avons donc préparé un filtrat de *E. coli* ϕ comme précédemment et une solution en eau physiologique de phénergan à 2 p. 100, et avons répété les mêmes expériences en substituant le phénergan à l'histamine.

EXPÉRIENCE III. — Sur un lot de 15 lapins, les 5 premiers reçoivent dans la peau un mélange de 0,5 cm³ de filtrat d'*E. coli* + 0,5 cm³ de phénergan et en même temps, dans la veine, 1 cm³ de filtrat pur. Les 5 suivants reçoivent dans la peau 0,5 cm³ de filtrat pur et en même temps, dans la veine, un mélange de 1 cm³ de filtrat + 1 cm³ de phénergan. Enfin les 5 derniers reçoivent dans la peau un mélange de 0,5 cm³ de filtrat + 0,5 cm³ de phénergan et en même temps, dans la veine, un mélange de 1 cm³ de filtrat + 1 cm³ de phénergan. Après vingt-quatre heures, tous ces animaux reçoivent leur injection déchaînante : 3 lapins de chaque catégorie reçoivent 2 cm³ de filtrat pur et 2 lapins reçoivent un mélange de 2 cm³ de filtrat + 1 cm³ de phénergan.

Résultats. — Aucun de ces animaux n'a présenté de réaction hémorragique, ni de Shwartzman ni de Sanarelli, et ces constatations sont confirmées par l'autopsie pratiquée vingt-quatre heures après l'injection déchaînante.

EXPÉRIENCE IV. — Un lot de 24 lapins est divisé en quatre groupes de 6 lapins. Le premier groupe reçoit dans la peau 0,5 cm³ de filtrat pur et en même temps, dans la veine, 1 cm³ de phénergan. Le

deuxième groupe reçoit dans la peau un mélange de 0,5 cm³ de filtrat + 0,5 cm³ de phénergan et en même temps, dans la veine, 1 cm³ de phénergan. Le troisième groupe reçoit dans la peau un mélange de 0,5 cm³ de filtrat + 0,5 cm³ de phénergan et rien dans la veine. Le quatrième groupe reçoit dans la veine un mélange de 1 cm³ de filtrat + 1 cm³ de phénergan et rien dans la peau. Après vingt-quatre heures, nous effectuons des injections déchaînantes : 4 lapins de chaque groupe reçoivent 2 cm³ de filtrat pur et 2 lapins un mélange de 2 cm³ de filtrat + 1 cm³ de phénergan.

Résultats. — Les trois premiers groupes ont présenté un Shwartzman typique et les lapins du dernier groupe ont présenté un Sanarelli disséminé dans le poumon, les reins, l'intestin et le tractus génital.

De ces expériences on garde également l'impression que la diminution de la perméabilité vasculaire produite par le phénergan ne semble pas non plus jouer un rôle effectif dans le déterminisme de la non-apparition du phénomène, puisque les réactions hémorragiques classiques de Shwartzman et de Sanarelli apparaissent régulièrement.

En conclusion, l'ensemble des faits expérimentaux que nous venons de rapporter met en évidence que la perméabilité vasculaire modifiée, au cours des injections, préparante et déchaînante, à l'aide de l'histamine pour l'augmenter et à l'aide du phénergan pour la diminuer, n'a pas entravé la production de la réaction de Shwartzman et de Sanarelli préparée classiquement. De sorte que l'hypothèse du rôle de la perméabilité vasculaire dans le déterminisme de la non-apparition du phénomène hémorragique ne peut pas être soutenue.

Voyons maintenant la troisième hypothèse : le problème du facteur de diffusion, « Spreading Factors » de Duran-Reynals [10]. Depuis les travaux de cet auteur, on sait que l'extrait testiculaire contient un principe remarquable par ses qualités de diffusion et de perméabilisation. En tenant donc le même raisonnement que pour l'histamine, on peut imaginer que sous l'influence du facteur de diffusion, le filtrat préparant, en se dispersant dans les tissus, ne pourra plus exercer une activité suffisante pour que le filtrat déchaînant puisse rencontrer un terrain favorable à son action.

Or, contrairement à ce qu'on aurait pu penser, la réaction hémorragique apparaît promptement et avec force. Nous apportons ici le protocole de quelques-unes de ces expériences.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

L'extrait testiculaire (E. T.) a été préparé, en partant de testicules de bœuf, par la méthode de Duran-Reynals [41]. L'extrait

obtenu a été utilisé en solution physiologique à 1 p. 100. Le filtrat d'*Escherichia coli* ϕ est obtenu, comme auparavant, d'une culture en bouillon Difco âgée de 6 jours. Les lapins ont été choisis parmi les plus robustes, de poids sensiblement égal d'environ 1 950 à 2 000 g.

Le test de diffusion de notre extrait a été effectué au trypan bleu. Le mode d'injection a été le même que pour les expériences précédentes, c'est-à-dire que le filtrat d'*E. coli* et l'extrait testiculaire sont utilisés, suivant le cas, en mélange ou séparément.

EXPÉRIENCE V. — A 6 lapins, nous injectons dans la peau du flanc 0,5 cm³ de filtrat pur et en même temps, dans la veine, un mélange composé de 1 cm³ de filtrat + 1 cm³ d'E. T. Après un délai de vingt-quatre heures, nous pratiquons l'injection déchainante et chaque animal reçoit 2 cm³ de filtrat pur.

Résultat. — On constate que 1 lapin est porteur d'une large plaque hémorragique de Schwartzman apparue après trois heures; 3 lapins ont développé des réactions importantes de Schwartzman après cinq heures. Des 2 lapins restants, un était porteur d'un Schwartzman positif après sept heures et l'autre est mort le lendemain, en présentant une réaction de Schwartzman bien prononcée et une réaction de Sanarelli fort accusée dans les deux reins et l'un des poumons.

EXPÉRIENCE VI. — A 6 lapins, nous injectons dans la peau un mélange de 0,5 cm³ de filtrat + 0,5 cm³ d'E. T. et en même temps, dans la veine, 1 cm³ de filtrat pur. Après vingt-quatre heures, nous pratiquons l'injection déchainante de 2 cm³ de filtrat pur.

Résultat. — Chez 5 lapins, une réaction de Schwartzman intense est apparue quatre heures après la déchainante. Le sixième lapin est mort huit heures après, présentant d'emblée la réaction de Schwartzman et de Sanarelli.

EXPÉRIENCE VII. — A 3 lapins, nous injectons un mélange de 0,5 cm³ de filtrat + 0,5 cm³ d'E. T. dans la peau du flanc et en même temps un mélange de 1 cm³ de filtrat + 1 cm³ d'E. T. dans la veine. Après vingt-quatre heures, nous pratiquons l'injection déchainante de 2 cm³ de filtrat pur.

Résultat. — Un lapin est mort au bout de deux heures avec un Sanarelli fortement positif dans le poumon et les reins. Les 2 lapins restants ont présenté, au bout de quatre heures, un Schwartzman couvrant toute la surface du flanc.

Ces expériences nous ont donc montré, d'une manière décisive, que loin de favoriser la non-apparition du phénomène hémorragique, l'extrait testiculaire a, au contraire, contribué à son

développement. Sous son action, on voit régulièrement se développer soit un Shwartzman, soit un Sanarelli et plus fréquemment les deux réactions à la fois. En vérité, l'extrait testiculaire s'est révélé un facteur activant et stimulant l'hémorragie et, en tout cas, contrebalançant les effets de l'injection préparante simultanée dans la peau et dans la circulation veineuse.

A ce propos, il est intéressant de rappeler que Bier [12], Duran-Reynals [13], Shwartzman [14] ont rapporté que l'extrait testiculaire ajouté au filtrat préparant renforce et accélère la réaction hémorragique de Shwartzman. Nous-même [15] avons montré que l'extrait cutané ou simplement un sérum sanguin ajoutés au filtrat se comportent comme l'extrait testiculaire en stimulant et accentuant le filtrat préparant à l'égard du phénomène de Shwartzman. Dans ces conditions, on peut se demander s'il n'est pas plus raisonnable de chercher dans l'action de l'extrait testiculaire un effet dû à la présence de protéines. Et, pour vérifier si cette hypothèse est défendable, nous nous sommes adressé à des protéines étrangères telles que le sérum de cheval, le blanc d'œuf, le lait de vache, couramment utilisés, on le sait, dans des recherches biologiques et cliniques.

EXPÉRIENCE VIII. — A 6 lapins, nous injectons dans la peau du flanc 0,5 cm³ de filtrat pur et en même temps, dans la veine, un mélange de 1 cm³ de filtrat + 1 cm³ de sérum de cheval. Vingt-quatre heures après, nous pratiquons l'injection déchainante de 2 cm³ de filtrat pur. Trois heures après, nous constatons que tous les animaux sont porteurs de vastes plaques hémorragiques de Shwartzman. Par la suite, un lapin est mort dans la nuit et un autre le lendemain. A l'autopsie, nous découvrons des lésions hémorragiques de Sanarelli dans le poumon, les reins et le péritoine pariétal.

EXPÉRIENCE IX. — A un lot de 8 lapins, nous injectons dans la peau du flanc un mélange de 0,5 cm³ de filtrat + 0,5 cm³ de sérum de cheval et en même temps, dans la veine, 1 cm³ de filtrat pur. Vingt-quatre heures après, nous pratiquons l'injection déchainante de 2 cm³ de filtrat pur.

Résultat. — Deux heures après, on est déjà en présence d'un Shwartzman sévère chez 5 animaux, les 3 autres sont morts quatre heures après, présentant d'emblée un Shwartzman et un Sanarelli fortement prononcés à la peau et dans les viscères.

EXPÉRIENCE X. — A 7 lapins, nous injectons dans la peau du flanc un mélange de 0,5 cm³ de filtrat + 0,5 cm³ de sérum de cheval et en même temps, dans la veine, un mélange de 1 cm³ de filtrat + 1 cm³ de sérum de cheval. Vingt-quatre heures après, nous pratiquons l'injection déchainante de 2 cm³ de filtrat pur.

Résultat. — Quatre lapins ont présenté un Shwartzman positif et 3 négatifs. Les 3 lapins négatifs sont sacrifiés et l'autopsie

découvre un Sanarelli dans le poumon, les reins et le tractus génital.

Devant ces résultats positifs, nous avons remplacé le sérum de cheval par le lait de vache et par le blanc d'œuf.

Nous avons utilisé, à cet effet, le lait cru provenant d'une vache saine qui vient d'être traite et le blanc d'œuf obtenu par ponction à l'aide d'une seringue stérile d'un œuf fraîchement pondu.

Ces expériences, effectuées chez une trentaine de lapins pour chacun de ces produits, nous ont donné des résultats absolument semblables.

L'ensemble de toutes ces expériences nous apporte donc une confirmation du fait que des protéines telles que le sérum de cheval, le blanc d'œuf, le lait de vache, se comportent comme l'extrait testiculaire. Et il se dégage, de toutes ces investigations, deux faits saillants : d'une part, c'est que les phénomènes de non-apparition de la réaction hémorragique de Shwartzman et de Sanarelli conditionnée par la double injection préparante, intradermique et intraveineuse, des toxines microbiennes ne sont nullement influencés par des modifications de perméabilité capillaire aussi bien dans le sens de l'accroissement que dans le sens de la diminution et, d'autre part, c'est l'accentuation du phénomène hémorragique par l'adjonction à cette double injection préparante d'extrait testiculaire, de sérum de cheval, de blanc d'œuf et de lait de vache. Dans le premier cas, l'organisme n'a pas réagi, la réaction hémorragique n'apparaît donc pas. Dans le deuxième cas l'organisme a réagi et la réaction hémorragique apparaît. On est tenté naturellement de faire appel, pour interpréter ces aspects négatifs et positifs du comportement de l'organisme, à quelques principes nouveaux à rapprocher des phénomènes d'allergie et d'anergie. Nous nous gardons cependant de formuler une telle conclusion que nous croyons prématurée et nous nous bornons aujourd'hui à la seule exposition des faits observés.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] G. SANARELLI. *Ces Annales*, 1924, **38**, 11-71.
- [2] G. SHWARTZMAN. *J. exp. Méd.*, 1928, **48**, 247-268. — *Phenomenon of local tissue Reactivity*. Paul B. Hoeber, Inc. 1937, New-York.
- [3] A. GRATIA et R. LINZ. *Ces Annales*, 1932, **49**, 131-185.
- [4] P. BORDET. *Ces Annales*, 1936, **56**, 357-399.
- [5] A. ALECHINSKY. *Ces Annales*, 1939, **63**, 41-92.
- [6] H. GROSS. *Zentrabl. Bakt. Orig.*, 1931, **122**, 96-99.
- [7] T. OGATA. *J. exp. Med.*, 1936, **63**, 54-68.
- [8] Difco Manual, Eighth Edit., Difco Laboratories, Détroit, Michigan.
- [9] B. N. HALPERN. *Les acquisitions médicales récentes*, 1948 et 1950. Editions médicales Flammarion.

- [10] F. DURAN-REYNALS. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 6-7 ; *J. exp. Med.*, 1929, **50**, 327-340 ; *Bact. Rev.*, 1942, **6**, 197-252.
- [11] F. DURAN-REYNALS. *J. exp. Med.*, 1937, **65**, 661-670.
- [12] O. G. BIER. *Folia clinica*, 1932, **4**, 161-164 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 407-410.
- [13] F. DURAN-REYNALS. *J. exp. Med.*, 1933, **58**, 451-463.
- [14] G. SHWARTZMAN. *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 621-644.
- [15] A. ALECHINSKY. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 289-291 ; 1937, **124**, 291-292.

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU RÔLE DU BEURRE,
DE L'HUILE DE COLZA ET DE L'HUILE DE VASELINE
ASSOCIÉS A DES BACILLES TUBERCULEUX
VIVANTS OU MORTS, INOCULÉS AU COBAYE
PAR LES VOIES SOUS-CUTANÉE ET TESTICULAIRE**

par P. GASTINEL et A. NEVOT (*).

(Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine.)

Dans une note présentée à la Société de Microbiologie, en mai 1948, nous avons envisagé l'influence de la voie d'inoculation des bacilles tuberculeux sur l'apparition de l'allergie cutanée chez le cobaye. Des cobayes, de 300 g environ, avaient reçu par voies sous-cutanée, intramusculaire, intratesticulaire, intratrachéale, intrapéritonéale, une dose de 0,1 mg de bacilles frais ; par voie intraveineuse, 1/2 cm³ de rinçage d'une seringue ayant contenu l'émulsion de bacilles tuberculeux utilisée pour les autres voies d'épreuve.

Les conclusions de ce travail avaient été les suivantes : « Les lésions intéressant la peau provoquent la sensibilisation allergique avec précocité et régularité ; par contre, l'introduction de bacilles de Koch, par les autres voies, ne s'accompagne d'une sensibilisation allergique cutanée que dans des conditions beaucoup moins marquées, sauf si, au cours de l'intervention d'inoculation, le tissu sous-cutané est intéressé ». Par la voie testiculaire, nous avons même noté que l'allergie ne se traduisait que par un très faible épaissement de la peau que nous n'osions considérer comme réaction positive, tant il s'agissait d'un phénomène estompé.

Depuis 1948, en plusieurs étapes, nous avons poursuivi l'étude de l'allergie tuberculique sur des cobayes inoculés par voie sous-cutanée et par voie intratesticulaire avec des bacilles tuberculeux vivants ou morts, en suspension dans de l'eau physiologique ou dans des corps gras de diverses origines : animale, végétale, et dans de l'huile de vaseline. Ce sont les résultats de

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 8 novembre 1951.

ces dernières recherches que nous allons exposer dans ce mémoire.

L'étude de l'influence de l'enrobage des *bacilles tuberculeux morts* dans des huiles végétales, de l'huile de vaseline, de la paraffine a été faite par de nombreux expérimentateurs, notamment en France par E. Coulaud, A. Saenz et G. Canetti, Noël Rist (1) ; leurs travaux sont bien connus et ont apporté de sérieuses modifications à des données considérées pendant longtemps comme classiques, à savoir : le faible pouvoir allergisant des bacilles morts et le caractère strictement local des lésions déterminées par ces mêmes bacilles. Tout au contraire, ces auteurs ont montré que l'enrobage des germes tués, dans les substances mentionnées ci-dessus, produit chez les animaux inoculés une allergie très nette et, d'autre part, de la lésion locale, les bacilles essaient dans les divers territoires lymphatiques et dans les viscères.

Les expériences que nous avons poursuivies, avec une technique quelque peu différente de celle employée par les auteurs précités, nous ont donné des résultats qui seront détaillés dans la suite.

Quant à l'influence des corps huileux sur la virulence et le pouvoir pathogène des *bacilles tuberculeux vivants*, à notre connaissance, elle n'a été recherchée, chez le lapin, que par A. Saenz et G. Canetti, dans le but très particulier d'étudier le déterminisme des lésions spéciales par les bacilles enrobés dans l'huile de vaseline.

Notre protocole expérimental a été le suivant : nous avons utilisé au total 136 cobayes répartis en quatre groupes ; deux ont reçu des bacilles vivants sous la peau ou dans le testicule, les deux autres ont été inoculés par les mêmes voies avec des bacilles morts. Dans chaque groupe, qu'il s'agisse de microbes vivants ou tués, des animaux, représentant des témoins, ont reçu seulement l'émulsion bacillaire en eau physiologique ; les autres ont été injectés, selon une technique que nous décrirons plus loin, avec cette même émulsion bacillaire déposée dans une matière grasse ou huileuse préalablement insérée sous la peau ou dans le testicule.

Nous avons utilisé deux types de corps gras : l'un d'origine animale : le beurre ; l'autre d'origine végétale : l'huile de colza ; une troisième substance d'enrobage des bacilles tuberculeux a été l'huile de vaseline.

Ainsi, pour chaque groupe d'animaux avons-nous : un premier

(1) Nous rappelons qu'une étude antérieure sur un sujet analogue a été faite par Bezançon et Philibert, Boquet et Nègre, Laporte.

lot n'ayant reçu que l'émulsion bacillaire ; les deuxième, troisième et quatrième lots ayant été injectés par cette même suspension microbienne déposée dans un des excipients mentionnés.

Les bacilles tuberculeux vivants ou morts utilisés ont été prélevés sur des cultures de trois semaines à un mois, entretenus sur pomme de terre ensemencée de la souche bovine Dupray des collections de l'Institut Pasteur.

Les doses utilisées seront indiquées à propos de chaque groupe d'étude, dont les résultats seront exprimés en tenant compte :

- a) De l'intensité de la lésion locale : chancre ou orchite ;
- b) De l'évolution de l'infection ;
- c) De la sensibilisation tuberculinique ;
- d) Des lésions relevées à l'autopsie.

I. — COBAYES ÉPROUVÉS AVEC DES BACILLES VIVANTS PAR VOIE SOUS-CUTANÉE.

Nous avons utilisé des cobayes femelles d'un poids moyen de 350 g environ, qui ont reçu dans la région para-ombilicale (2), sous le volume de 1/10 de centimètre cube, de 0,04 mg à 0,1 mg de bacilles pesés frais. Les animaux éprouvés avec les corps gras ou l'huile de vaseline recevaient préalablement, au point d'injection indiqué, de 0,5 cm³ à 1 cm³ de support à étudier, et c'est dans la masse du beurre ou de l'huile qu'était faite l'inoculation de l'émulsion des bacilles vivants en eau physiologique.

Notre technique a été, par conséquent, différente de celle préconisée par E. Coulaud et les autres expérimentateurs déjà cités, qui mélangeaient soigneusement dans un mortier les bacilles tuberculeux et leur support avant l'injection.

a) *Cobayes témoins ayant reçu l'émulsion bacillaire seule : 13.*

Les *chancres* sont apparus nettement constitués à partir du douzième jour atteignant, comme plus fortes dimensions, 2 cm × 2 cm.

Au point de vue *allergique*, les animaux ont présenté, du seizième jour à leur mort, survenue du trente et unième au quatre-vingt-deuxième jour, une réponse positive à l'injection de 1/100 de tuberculine brute de l'Institut Pasteur.

A l'*autopsie*, les lésions *ganglionnaires*, généralisées, ont été le plus souvent très accusées ; le *foie*, hypertrophié, dégénéré, a atteint au maximum le poids de 48 à 56 g ; la *rate*, très augmentée de volume, est apparue parfois bosselée par des tubercules nets, d'autres fois lisse,

(2) Nous préconisons toujours ce mode d'inoculation chez le cobaye parce que les réactions ganglionnaires frappent symétriquement les ganglions pré-cruraux et les ganglions axillaires fournissant un tableau clinique plus riche que lorsque l'injection est faite à la face interne d'une cuisse, créant à l'origine une réaction lymphatique seulement localisée au ganglion pré-crural correspondant.

sans modification marquée de la surface ; nous avons relevé des poids de 4 g, 8 g, 9,5 g ; le *poumon* s'est montré farci de tubercules, parfois coalescents, le viscère atteignant 4,5 g, 5 g. Dans quelques cas il a été noté un épanchement pleural abondant.

b) *Cobayes ayant reçu la suspension bacillaire et le beurre* : 16.

Les *chancres* sont apparus plus tôt que les précédents et surtout ils ont atteint des dimensions insolites, énormes : 3 cm × 3 cm au seizième jour et jusqu'à 7 cm × 5 cm au soixantième jour ayant presque envahi toute la surface cutanée abdominale.

Les cobayes sont morts du trente-cinquième au quatre-vingtième jour, après avoir présenté à plusieurs épreuves, échelonnées sur un même animal du seizième au soixantième jour, une sensibilisation tuberculinique nettement plus faible que chez les témoins.

Les *altérations ganglionnaires* étaient aussi marquées que dans le groupe précédent ; dans certains cas le *foie*, très volumineux, atteignait un poids très élevé, jusqu'à 88 g chez un cobaye mort au soixante-quinzième jour ; la *rate*, énorme, sans tubercule apparent, présentait dans un cas des dimensions de 6,1 cm × 3,1 cm avec un poids de 15 g ; les *lésions pulmonaires* ont été accusées et des poids de 7 g et 9 g ont été relevés.

En résumé, cette série d'expériences avec le beurre, comme support, s'est signalée par des chancres d'apparition plus précoce, mais surtout d'une étendue considérable, pouvant gagner presque toute la paroi abdominale, par une allergie moins marquée que chez les témoins et des lésions généralement plus intenses, certaines vraiment considérables n'ayant jamais été notées chez les cobayes ayant reçu la suspension microbienne seule.

En raison des caractères très accusés des processus lésionnels, on pourrait être surpris de la faible intensité des réactions allergiques, mais une discordance de même ordre entre la sensibilisation tuberculinique et l'intensité des lésions d'inoculation avait déjà été observée par Saenz, opérant avec des bacilles morts enrobés dans un autre produit gras d'origine animale : la lanoline. On sait d'ailleurs fort bien, sur le plan clinique, qu'on ne peut établir un parallélisme entre l'intensité des lésions anatomiques et celle de la tuberculino-réaction.

c) d) *Cobayes ayant reçu la suspension bacillaire et l'huile de colza ou l'huile de vaseline* : 12.

Nous rassemblons ces deux groupes c et d parce que les résultats obtenus avec l'huile de colza ou l'huile de vaseline nous ont paru très voisins.

Les *chancres* n'ont pas dépassé une surface de 2 cm × 2 cm ; les animaux sont morts en des temps voisins de ceux relevés chez les témoins. Du point de vue allergique la *réaction à la tuberculine brute* de l'Institut Pasteur, diluée au 1/100, n'a pas présenté une intensité

supérieure à celle manifestée par les témoins, mais elle a été nettement plus forte que celle obtenue chez les cobayes inoculés avec du beurre.

Les *lésions ganglionnaires* ont souvent été considérables ; le *foie*, hypertrophié, dégénéré, n'a jamais dépassé les poids signalés pour les témoins, mais nous avons eu des *rates* pesant 8, 9 et 13 g ; les *lésions pulmonaires* n'ont pas eu un développement digne de remarque par rapport à celles observées chez les animaux éprouvés seulement avec l'émulsion bacillaire.

En résumé, seules les lésions ganglionnaires et spléniques nous ont paru parfois plus accusées que chez les témoins.

II. — COBAYES ÉPROUVÉS AVEC DES BACILLES VIVANTS PAR VOIE TESTICULAIRE.

Les cobayes utilisés pour les expériences avaient un poids dépassant le plus souvent 400 g. Les témoins ont reçu dans le testicule, sous le volume de 1/10 de centimètre cube, de 0,04 mg à 0,1 mg de bacilles pesés à l'état frais. Ceux éprouvés avec les corps gras ou l'huile de vaseline ont d'abord eu dans le testicule une injection de 0,2 cm³ du support à étudier et, comme pour les animaux éprouvés par voie sous-cutanée, c'est dans le beurre ou dans l'huile qu'était faite l'inoculation des bacilles vivants en eau physiologique.

Il nous est apparu qu'il était difficile d'injecter dans le testicule un volume supérieur à 0,3 cm³. Cette glande possède, en effet, une enveloppe fibreuse résistante et l'inoculation d'un volume de 1 cm³, comme l'ont fait beaucoup d'auteurs, crée une forte distension de l'organe aboutissant à un reflux du liquide injecté soit vers l'extérieur, au point d'injection, soit dans le canal vagino-péritonéal, expliquant, sans doute, dans ce dernier cas, les lésions massives d'épiploïte décrites par ces auteurs. Et il est permis de se demander si les lésions pulmonaires particulièrement intenses, mentionnées chez les cobayes ayant reçu dans le testicule une telle quantité de liquide, n'ont pas été influencées par les lésions péritonéales relevées sur les cobayes en expérience.

a) *Cobayes témoins ayant reçu la suspension bacillaire seule* : 18.

L'*orchite* est apparue vers le cinquième jour et les animaux sont morts du vingt-cinquième au soixantième jour.

Les *intradermo-réactions* à la tuberculine, pratiquées les quinzième et vingt-cinquième jours ont été faibles, se manifestant seulement par un léger épaissement de la peau ; elles ont été parfois négatives, comme nous l'avions déjà signalé dans notre communication de 1948 à la Société de Microbiologie sur les variations de la sensibilité tuberculinique selon les voies d'inoculation.

D'une manière générale, à quelques exceptions près qui seront men-

tionnées plus loin, les lésions ganglionnaires ont été moins marquées que chez les cobayes inoculés par voie sous-cutanée. Le plus généralement, le *testicule* avait le volume d'une noisette et il présentait à la coupe une masse caséuse plus ou moins étendue, plus ou moins ramollie. Il a été noté avec les fortes doses de 0,1 mg des lésions du *gubernaculum testis* et de l'épiploon ; nous les avons rencontrées moins souvent chez des cobayes inoculés avec des doses plus faibles. *Foie, rate, poumons* ont parfois présenté des lésions intenses et des poids de 50 g et de 10 g ont été relevés respectivement pour les deux premiers organes. En même temps que les lésions pulmonaires accentuées, nous avons noté des atteintes prononcées des ganglions trachéo-bronchiques.

b) *Cobayes ayant reçu la suspension bacillaire et le beurre : 13.*

L'orchite est encore apparue vers le cinquième jour et les animaux sont morts dans les délais indiqués pour les témoins.

Le plus souvent, l'*intradermo-réaction* s'est montrée faible et les réactions positives n'ont pas été plus évidentes que chez les cobayes ayant reçu seulement la suspension bacillaire.

A l'*autopsie*, il a été constaté des lésions plus volumineuses du testicule que chez les témoins, avec extension fréquente, surtout avec les fortes doses, au canal vago-péritonéal, à l'épiploon ; les lésions péritonéales accusées s'accompagnaient généralement de lésions pulmonaires accentuées ; les lésions des viscères abdominaux n'ont pas retenu spécialement notre attention par leur intensité.

Ce qui donne à ce groupe d'animaux inoculés un caractère un peu particulier, c'est, d'une part, des lésions testiculaires plus intenses que chez les témoins et, d'autre part, l'extension plus fréquente et plus accusée du processus tuberculeux au péritoine et au poumon. Enfin, il paraît nécessaire de souligner que la sensibilisation tuberculinique n'a pas été plus marquée que chez les témoins.

c) d) *Cobayes ayant reçu la suspension bacillaire et l'huile de colza ou l'huile de vaseline : 9.*

Comme pour les inoculations sous-cutanées, et pour les mêmes raisons, nous rassemblons ces deux groupes parce qu'ils nous ont donné des réponses comparables.

Les *orchites* ont été moins marquées qu'avec le beurre et, dans l'ensemble, intradermo-réaction et lésions se sont rapprochées de celles observées chez les témoins.

Ceci porte à conclure que les substances huileuses injectées dans les testicules en même temps que les bacilles tuberculeux vivants et virulents ne changent guère les qualités pathogènes de ces microbes. Et cette remarque est de l'ordre de celle faite par A. Saenz et G. Canetti qui, après injection, dans le testicule de 2 lapins, de 40 mg de bacilles bovins vivants et virulents enrobés dans de l'huile de vaseline, concluent que « l'enrobage huileux n'ajoute pas grand'chose à l'activité pathogène du germe ».

Il nous a paru, toutefois, qu'il fallait faire une exception pour

le beurre, dont la composition lipidique contient peut-être des facteurs facilitant la diffusion des bactéries, sans augmenter, cependant, la sensibilisation tuberculinique.

III. — COBAYES ÉPROUVÉS PAR DES BACILLES TUBERCULEUX BOVINS, MORTS, INOCULÉS PAR VOIES SOUS-CUTANÉE OU INTRATESTICULAIRE, SEULS OU EN SUSPENSION DANS DU BEURRE, DE L'HUILE DE COLZA OU DE L'HUILE DE VASELINE.

Cette partie expérimentale a fait l'objet de travaux importants que nous avons mentionnés au début de cette note.

Nous ne l'avons étudiée qu'à titre de comparaison tout à la fois avec les résultats obtenus par nos devanciers et avec ceux obtenus par nous-mêmes avec les bacilles vivants.

Loin d'employer les doses aussi fortes que nos prédécesseurs qui ont utilisé jusqu'à 100 mg de bacilles morts, nous avons conduit nos expériences en reprenant soit les quantités déjà utilisées pour les bacilles vivants, soit des quantités de dix à cent fois plus fortes, atteignant par conséquent 10 mg au maximum. Et ceci explique combien nos résultats diffèrent de ceux de nos devanciers.

Avec les *B. K. seuls, aux doses faibles*, au-dessous du milligramme, qu'il s'agisse de la *voie sous-cutanée* ou de la *voie intratesticulaire*, nous n'avons obtenu aucune réponse locale : ni chancre, ni orchite. L'allergie a été négative ou passagèrement faiblement positive ; des cobayes sensibilisés au trentième jour ont donné par la suite, au deux centième jour, une intradermo-réaction négative. Tous ont pris de l'embonpoint et ont été sacrifiés deux cents à trois cents jours après inoculation, ne présentant aucune lésion macroscopique à l'autopsie. Cependant, chez certains cobayes, le testicule inoculé s'est montré plus mou, plus vascularisé que le testicule normal.

Qu'il ait été adjoint au *B. K.* du beurre, de l'huile de colza ou de l'huile de vaseline, les résultats ont été absolument comparables à ceux mentionnés pour les bacilles seuls.

Un total de 30 cobayes a été utilisé pour ce groupe d'expériences, 17 pour la *voie sous-cutanée*, 13 pour la *voie intratesticulaire*.

Aux fortes doses que nous avons utilisées, c'est-à-dire au maximum 10 mg de bacilles tués, par *voie sous-cutanée*, nous avons obtenu, avec les *B. K. seuls* ou enrobés des excipients déjà nommés, de petits chancres de 1 mm à 3 mm de diamètre qui se sont rapidement cicatrisés ; les plus étendus (3 mm) ont été relevés sur des cobayes ayant reçu du beurre et des microbes morts.

L'allergie a été plus nettement positive qu'avec les doses faibles.

Les animaux ayant pris de l'embonpoint ont été sacrifiés à la fin du troisième mois ayant suivi l'inoculation ; ils n'ont présenté, à l'autopsie, aucune lésion autre que la cicatrice réduite du petit chancre initial.

Avec ces doses fortes de *B. K. seuls*, les cobayes éprouvés par *voie*

testiculaire n'ont donné que des réactions locales faibles ; l'allergie a été positive et, à l'autopsie, le testicule inoculé s'est montré plus mou, plus vascularisé que le testicule sain.

Les cobayes, qui ont reçu en même temps que les B. K. morts les diverses substances déjà citées, ont présenté une réaction testiculaire plus nette, une orchite plus ou moins accusée. L'allergie a été nettement positive. Les animaux ont engraisé, ils ont été sacrifiés après trois mois d'expériences et, à l'autopsie, il a été trouvé, à côté de testicules ayant les caractères mentionnés ci-dessus, des glandes renfermant un caséum riche en B. K.

Vingt-cinq cobayes ont été inoculés pour ce groupe d'expériences, 8 par voie sous-cutanée, 17 par voie intratesticulaire.

Ici encore, l'action du beurre nous a paru plus nette que celle de l'huile de colza ou de l'huile de vaseline. Aucune extension des lésions n'a été relevée.

La différence entre nos résultats et ceux de nos prédécesseurs tient sans doute, répétons-le, au fait qu'il est nécessaire d'inoculer des doses considérables de B. K. morts pour obtenir une allergie forte et précoce et aussi l'extension des lésions aux divers parenchymes de l'organisme, particulièrement au poumon.

L'action des corps gras et de l'huile de vaseline nous est apparue nulle quand la dose de B. K. morts inoculés est faible ; elle s'est fait sentir dans le même sens que pour les bacilles vivants quand les microbes morts sont injectés à des doses qui, à elles seules, déterminent déjà une réaction locale et l'allergie.

Tout comme pour les bacilles vivants, le beurre exerce sur l'intensité des lésions, une action plus nette que celle des autres excipients utilisés dans nos expériences.

Nous retrouvons donc les constatations faites jadis par Bezançon et Philibert sur le rôle éminent du beurre, susceptible même de rendre virulents des bacilles paratuberculeux à une dose normalement sans pouvoir pathogène lorsqu'ils sont inoculés seuls.

EFFETS DE LA CARENCE GLUCIDIQUE SUR L'INDUCTION D'UN *PSEUDOMONAS PYOCYANEA* LYSOGÈNE (*)

par FRANÇOIS JACOB.

(Institut Pasteur. Service de Physiologie microbienne.)

La possibilité d'induire la production de bactériophages en exposant une culture de bactéries lysogènes à l'action d'un rayonnement ultra-violet [1] a ouvert une nouvelle voie dans l'étude des relations entre bactéries et bactériophages. L'induction a été observée chez des espèces aussi différentes que *Bacillus megatherium* [1], *Escherichia coli* K 12 [2], *Pseudomonas pyocyanea* et *Staphylococcus aureus* [3]. Cependant, certaines souches lysogènes n'ont pu, jusqu'ici, être induites (*E. coli* Lisbonne [4], *B. megatherium* R 17 [5]).

Pour induire *B. megatherium* lysogène, il est nécessaire de le cultiver en milieu complexe [6]. On peut, au contraire, induire *P. pyocyanea* en milieu synthétique. Cette propriété permet de reprendre l'étude de l'induction dans des conditions plus simples.

Les données réunies dans ce mémoire concernent d'abord les conditions et les effets de l'irradiation U. V. chez une souche lysogène de *P. pyocyanea*, ensuite les changements apportés à l'efficacité du choc inducteur par la carence des cultures en aliment carboné. La carence effectuée *avant* l'irradiation est susceptible de modifier le *développement* des bactériophages ; la carence *après* l'irradiation, de modifier l'*aptitude* des bactéries à être induites par le choc U. V.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

I. SOUCHES BACTÉRIENNES. — La souche lysogène de *P. pyocyanea* utilisée dans ce travail est la souche P 13/8 A, mutant lysogène artificiel, isolé par étalement sur gélose de la souche

(*) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du *National Cancer Institute of the National Institutes of Health* des Etats-Unis d'Amérique.

indicatrice P 13 avec des bactériophages φ P 8, provenant de la souche P 8.

La souche P 8 de la collection de l'Institut Pasteur est lysogène, et le bactériophage qu'elle produit est actif sur la souche P 13. Dans une culture de P 8 en voie de croissance exponentielle, on trouve environ 1 bactériophage pour 1 000 bactéries. Les cultures de P 8 se lysent après irradiation par un rayonnement U. V., mais ne produisent qu'un bactériophage pour 2 ou 3 bactéries. On a pu montrer que 2 p. 100 seulement des bactéries libèrent des bactériophages [3]. Toutes les modifications du milieu ou des conditions de cultures destinées à améliorer le rendement en bactériophages ont échoué. Deux autres souches (P 4 et P 31) de la collection de l'Institut Pasteur se comportent de façon analogue. Ces différentes souches ne peuvent donc pas convenir à un travail quantitatif sur l'induction des bactéries lysogènes.

Après étalement sur gélose de la souche indicatrice avec un excès de bactériophages issus d'une souche lysogène, apparaissent des colonies résistantes. Certaines de ces colonies sont lysogènes et perpétuent le bactériophage utilisé pour l'étalement. Afin d'obtenir une souche dont les cultures puissent en totalité être induites par un rayonnement U. V., 10 colonies lysogènes de P 13 résistantes à φ P 8 ont été isolées. Les cultures de chacun des 10 clones, soumises à un rayonnement U. V. se lysent, mais le rendement en bactériophages varie selon les clones.

TABLEAU I. — Rendement en bactériophages après irradiation U. V de cultures provenant de 10 clones lysogènes artificiels (souche P 13 — bactériophage φ P 8).

P 13/8 A	80 φ				
— B	44 —		pour	1 bactérie.	
— C	36 —		—	1	—
— D	17 —		—	1	—
— E	14 —		—	1	—
— F	4 —		—	1	—
— G	1 —		—	1	—
— H	1 —		—	3	—
— I	1 —		—	15	—
— J	1 —		—	100 000	—

Les cultures en milieu liquide ont été irradiées avec une même dose d'U. V. (500 ergs mm².) Le rendement est obtenu en rapportant le nombre de bactériophages apparus après la lyse au nombre de bactéries irradiées.

Le classement donné par le tableau I s'est maintenu sensiblement constant au cours d'expériences réalisées dans différentes conditions de culture et avec différentes doses d'U. V. Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans la variation du rendement en bactériophages, mais il est clair que dans le cas des quatre derniers clones (G, H, I et J), seul un petit nombre de bactéries produit du bactériophage. La présence dans la souche P 8 ou dans la souche P 13 d'un autre bactériophage, méconnu faute de souche détectrice, serait susceptible d'expliquer en partie ces résultats. Nous avons utilisé la souche P 13/8 A.

Dans une culture de la souche P 13/8 A en voie de croissance exponentielle on trouve environ 1 bactériophage pour 30 bactéries. Pour un rendement unitaire moyen de 80, ceci correspond à la libération spontanée de bactériophages par 1 bactérie sur

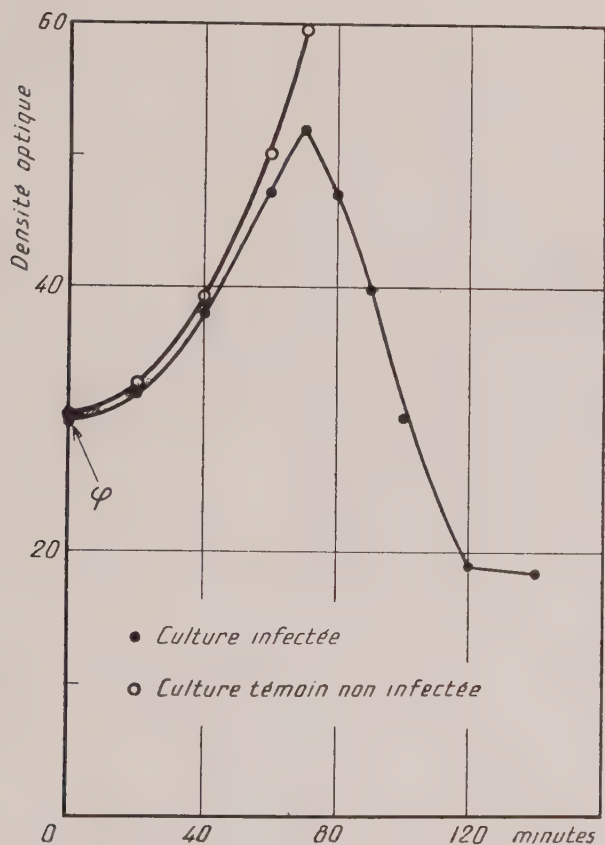


FIG. 1. — Infection de la souche sensible par le bactériophage φ P 8. Infection à temps 0 avec une multiplicité de dix bactériophages par bactérie. En ordonnée la densité optique. En abscisse le temps en minutes.

2 400. Une faible proportion des bactéries lysogènes étalées sur gélose avec la souche sensible donne des plages (2 à 5 p. 100).

II. BACTÉRIOPHAGE. — φ P 8 étalé sur gélose avec la souche indicatrice P 13 produit, en quinze heures à 37°, de petites plages de 1/4 à 1/2 mm de diamètre. Ces plages sont rapidement envahies

par une culture secondaire. On ne peut pas distinguer les plages dues aux bactériophages libres de celles dues aux bactéries lysogènes.

En milieu synthétique, 60 p. 100 des bactériophages sont adsorbés, en dix minutes à 37°, sur une suspension de P 13 titrant 10^8 bactéries par millilitre. La période latente est de soixante minutes, la phase de libération des bactériophages s'étale sur quarante minutes et le rendement unitaire moyen mesuré par des expériences à « cycle unique » [7] varie de 40 à 60 bactériophages par centre infectieux.

Si, pendant la croissance exponentielle d'une culture de P 13, on ajoute une quantité suffisante de ϕ P 8 pour que toutes les bactéries soient infectées en cinq minutes, la densité optique et la respiration de la culture continuent à croître pendant les soixante minutes de la période latente (fig. 1). On sait que, dans les mêmes conditions, la souche P 13 infectée par ϕ P 8 est encore capable de synthétiser des enzymes adaptatifs [8]. Toutefois, après élimination des bactériophages libres par du sérum spécifique, le nombre des centres infectieux n'augmente pas au cours de la période latente. L'augmentation de la densité optique, donc la croissance bactérienne, n'est pas accompagnée d'une élévation du nombre des bactéries. A l'examen microscopique, qui révèle un accroissement du volume bactérien, aucune division n'a été observée.

Le bactériophage ϕ P 8 est relativement résistant à l'action des rayons U. V. La courbe de survie de ce bactériophage est représentée sur la figure 3.

En injectant à des lapins une suspension purifiée et concentrée de ϕ P 8, on a obtenu un sérum spécifique antibactériophage qui, dilué au 1/500 dans du tampon, neutralise 99 p. 100 des bactériophages libres en cinq minutes à 37° dans du milieu synthétique ($K \sim 500$).

III. MILIEU. — Nous avons utilisé le milieu suivant :

$KH_2 PO_4$	13,6 g
$(NH_4)_2 SO_4$	2 g
$Mg SO_4, 7 H_2O$	0,2 g
$Ca (NO_3)_2$	0,01 g
$Fe SO_4, 7 H_2O$	0,0005 g
Eau	1 000 g
KOH	Q.S P. pH 7,0.

Le glucose est stérilisé à part et ajouté au moment de l'ensemencement. Le milieu gélosé utilisé pour les numérations de plages et de colonies contient :

Peptone Vaillant	20 g
Glucose	1 g
NaCl	5 g
Gélose	10 g
Eau	1 000 g

La souche supérieure contient 7 g de gélose p. 1 000.

IV. PRÉPARATION DES CULTURES. — a) *Cultures standard.* —

Une fiole de milieu contenant 1 g de glucose p. 1 000 est ensemencée avec 10^7 bactéries au millilitre et agitée à 37°. La concentration en aliment carboné est le seul facteur limitant la croissance qui s'arrête lorsque le glucose est épuisé [9]. La croissance est suivie par la mesure de la densité optique. Après l'arrêt de la croissance, la culture est centrifugée cinq minutes à 4 000 tours/minute pour éliminer les bactériophages libres. Quoique *P. pyocyanea* résiste assez mal aux centrifugations, il est préférable de ne pas employer du sérum antibactériophage, pour éviter de fournir à des bactéries très protéolytiques une source de carbone mal contrôlée. Après centrifugation, le culot bactérien est remis en suspension dans le milieu synthétique sans glucose et cette suspension est agitée trente minutes à 37° pour épuiser la majeure partie des réserves bactériennes. Ce traitement ne modifie la capacité des bactéries ni à être induites, ni à reproduire le bactériophage, et les cultures prises à ce stade sont considérées comme des cultures arrêtées mais non carencées.

b) *Cultures carencées.* — La carence proprement dite est obtenue en prolongeant, pendant le temps nécessaire, l'agitation à 37° des suspensions arrêtées. Au cours des six premières heures de ce traitement, une addition de glucose entraîne la reprise de la croissance en phase exponentielle. Après six heures de carence, la reprise de la croissance exponentielle est précédée d'une phase de latence qui atteint environ quarante minutes pour une carence de douze heures. Le nombre des bactéries donnant des colonies sur gélose n'est pas sensiblement modifié par douze heures de carence.

V. IRRADIATION. — L'irradiation est effectuée au moyen d'une lampe à vapeur de mercure à haute tension et basse pression donnant approximativement une énergie de 500 ergs mm^{-2} minute^{-1} pour la longueur d'onde 2 537 Å, la culture étant placée à 1 mètre de la lampe. Dans ce travail, les doses seront données en secondes d'irradiation à 1 m. Comme on le verra plus loin, la plus petite dose capable d'induire la presque totalité d'une culture de P 13/8 A correspond à une irradiation de quarante-cinq secondes à 1 mètre. Cette « dose optima » sera utilisée dans

les expériences pour lesquelles les conditions d'irradiation ne seront pas précisées. Avant l'irradiation, les suspensions titrant environ 10^8 bactéries/ml sont refroidies dans la glace fondante, puis elles sont placées en couche de 2 mm dans des boîtes de Petri et maintenues pendant le temps nécessaire sur un agitateur placé à 1 m de la lampe U. V. A partir de ce moment, toute la suite des manipulations est effectuée dans l'obscurité, les résultats de l'irradiation étant presque totalement réversibles à la lumière visible [3, 10].

VI. MESURE DE LA DENSITÉ OPTIQUE. — Les cultures sont réparties à raison de 5 ml par tube dans des tubes à section carrée et à faces parallèles. La densité optique est suivie à l'électrophotomètre de Meunier. Dans nos conditions expérimentales, un degré de l'appareil en lumière rouge correspond approximativement à 2.10^6 bactéries/ml.

VII. LES NUMÉRATIONS des bactéries induites et des bactéries survivant à l'irradiation sont effectuées, après dilutions convenables, par étalement sur gélose avec ou sans la souche indicatrice. Les étalements sont faits en double exemplaire. Les résultats numériques ainsi obtenus varient suivant la durée qui s'écoule entre l'irradiation et l'étalement sur gélose. Celui-ci, même dans l'obscurité, semble capable d'annuler partiellement les effets des rayons U. V. sur la souche lysogène P 13/8 A, pendant les quarante-cinq minutes qui suivent l'induction. Les facteurs responsables de la réversion n'ont pas encore été mis en évidence. Pour éviter cet effet, les cultures irradiées sont maintenues à 37° dans un agitateur et étalées seulement quarante-cinq minutes après l'irradiation.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

I. INDUCTION DE LA SOUCHE P 13/8 A. — 1° Comme on l'a déjà signalé, *P. pyocyanea* lysogène peut être induit en milieu synthétique par un rayonnement U. V. Les expériences résumées dans ce chapitre ont pour but de préciser les conditions et les effets de l'induction.

Après l'irradiation d'une culture standard de P 13/8 A (fig. 2), la croissance bactérienne se poursuit à vitesse réduite pendant les quatre-vingts premières minutes. La densité optique est alors approximativement doublée. Après quatre-vingts minutes, la courbe s'infléchit et la période de lyse s'étale sur soixante minutes. Le nombre relatif des centres infectieux, mesuré selon le principe de l'expérience à « cycle unique », commence à s'élever après quatre-vingts minutes et la libération de bactériophages se

poursuit pendant les soixante minutes de la période de lyse. Le rendement unitaire moyen obtenu au cours de l'expérience représentée par la figure 2 est de 81 bactériophages par centre infectieux. Il varie de 50 à 90 suivant les expériences.

La comparaison des figures 1 et 2 montre que la souche sensible infectée par le bactériophage ϕ P 8 et la souche lysogène

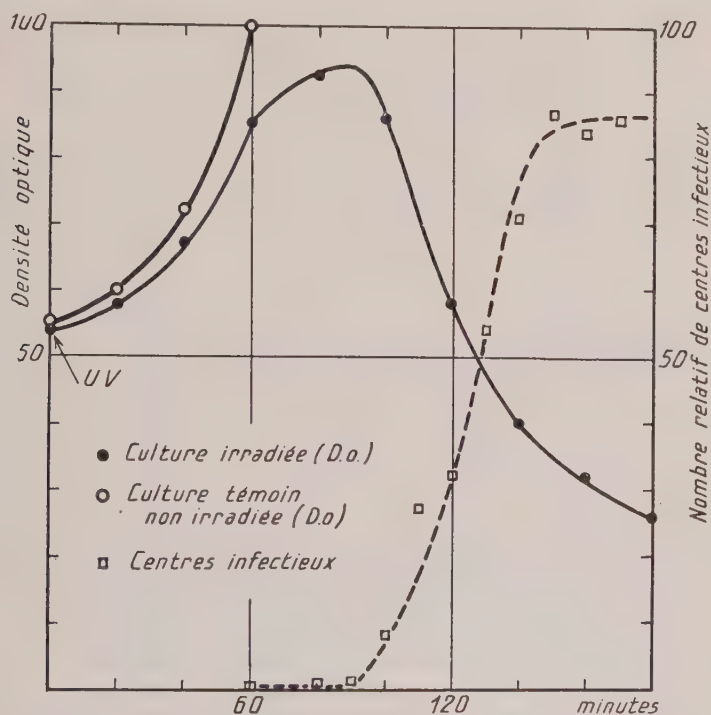


FIG. 2. — Induction de la souche lysogène. Irradiation à temps 0 pendant quarante-cinq secondes à 4 m. En ordonnée la densité optique et le nombre relatif des centres infectieux (expérience à « cycle unique »). En abscisse le temps en minutes.

irradiée se comportent de façon analogue. La période latente est sensiblement plus longue pour les bactéries lysogènes irradiées — 80 à 90 m — que pour les bactéries sensibles infectées — 60 m. Dans les deux cas, le nombre des centres infectieux ne suit pas l'augmentation de la densité optique observée au cours de la phase latente.

2° Rendement individuel des bactéries. — L'expérience, qui consiste à mesurer séparément le nombre des bactériophages formés par des bactéries isolées, a été réalisée selon la tech.

TABLEAU II. — Rendement individuel
des bactéries lysogènes irradiées.

NOMBRE DE BOITES	NOMBRE DE PLACES
52	0
2	1
1	11
1	13
1	19
1	23
1	42
2	51
1	55
1	56
1	57
1	60
1	63
1	72
1	74
1	84
1	87
1	94
1	98
1	112
1	123
1	137
1	148
1	182
1	196
1	201
1	245
1	247
1	282
Total. . . 82	Total . . . 2 881 + 2

Une culture de P 13/8 A, irradiée pendant quarante-cinq secondes à 1 mètre, est diluée dans du milieu glucosé de manière à obtenir approximativement 1 bactérie par ml. Cette suspension est ensuite distribuée en tubes à raison de 0,5 ml par tube. Les tubes sont maintenus à 37° à l'obscurité pendant trois heures, c'est-à-dire trente minutes après la lyse optique d'un témoin non dilué. Les contenus des tubes sont alors étalés sur gélose avec la souche indicatrice.

nique de Burnet [11], modifiée par Delbrück [12]. Après l'irradiation, la culture est diluée et répartie en tubes de manière à obtenir approximativement 1 bactérie dans deux tubes. Après un séjour de trois heures à l'étuve, le contenu de chaque tube est étalé sur gélose avec la souche indicatrice. Le résultat d'une telle expérience est rapporté dans le tableau II. On voit que 52 tubes n'ont pas donné de plages et que 2 tubes en ont donné 1. Ces deux plages peuvent raisonnablement être attribuées à des bactériophages libres ou à des bactéries non lysées. On peut donc considérer que sur 82 tubes, 54 ne contenaient pas de bactéries productrices de bactériophages. Ces bactéries sont réparties dans les tubes suivant une distribution de Poisson, dont la formule générale est :

$$P(r) = \frac{m^r}{r!} e^{-m}$$

$P(r)$ est la proportion des tubes contenant r bactéries produisant des bactériophages, quand le nombre moyen de ces bactéries par tube est m . On peut alors calculer m car :

$$P(0) = e^{-m} = \frac{54}{82} = e^{-0,41}.$$

Le calcul prévoit ainsi :

Tubes avec 1 bactérie produisant des bactériophages	23
Tubes avec 2 bactéries produisant des bactériophages.	4
Tubes avec 3 bactéries produisant des bactériophages.	1

Dans l'expérience représentée par le tableau II, on peut estimer que 34 bactéries ont produit 2 881 bactériophages. Le rendement individuel varie de 9 à 182 et le rendement unitaire moyen est $\frac{2\ 881}{34}$, soit 84 bactériophages par bactérie.

3° *Action de la dose de rayons U. V.* — Dans les expériences précédentes, les irradiations ont été effectuées avec une dose unique d'U. V. correspondant à la « dose optima ». Pour préciser l'influence de la dose d'U. V. sur le nombre des bactéries induites (formant des plages sur la souche indicatrice) et des bactéries survivantes (formant des colonies sur gélose), différentes fractions d'une même culture ont été soumises à des irradiations de durées variables. Sur la figure 3, qui reproduit les résultats de cette expérience, sont également portées les courbes de survie du bactériophage ϕ P 8 (courbe 1) et de la souche sensible P 13 (courbe 4). La courbe 2 indique pour chaque dose d'U. V. la fraction des bactéries lysogènes P 13/8 A induites. Pour les doses faibles, la courbe s'élève rapidement vers un maximum de 90 à 95 p. 100 qui est atteint avec quarante-cinq secondes d'irradiation. Après un palier, le nombre des centres infectieux décroît exponentiellement lorsqu'on augmente la dose. La courbe de survie des centres infectieux revêt sensiblement la forme d'une sigmoïde correspondant à un effet d'ordre multiple par rapport à la courbe exponentielle de survie du bactériophage libre. On retrouve ainsi les résultats obtenus par Weigle et Delbrück [2] avec *E. coli* K 12. Sur la figure 3, la multiplicité de l'effet se situe entre 3 et 4.

L'examen de la figure 3 montre que :

a) Pour la dose « optima » de quarante-cinq secondes, on trouve 95 p. 100 des bactéries lysogènes induites, moins de 5 p. 1 000 bactéries lysogènes survivantes et 2 p. 100 des bactéries sensibles survivantes. La souche indicatrice P 13 n'est donc guère plus résistante que la souche lysogène P 13/8 A à l'action des rayons U. V. Contrairement aux résultats trouvés

avec *B. megatherium*, les doses inductrices sont très voisines des doses mortelles chez *P. pyocyanea*.

b) Avec une dose de quinze secondes on trouve 18 p. 100 de survivants dans la culture de P 13/8 A pour 28 p. 100 seulement d'induits. Puisque avec des doses plus fortes on peut induire jusqu'à 95 p. 100 de la population, il faut admettre que les

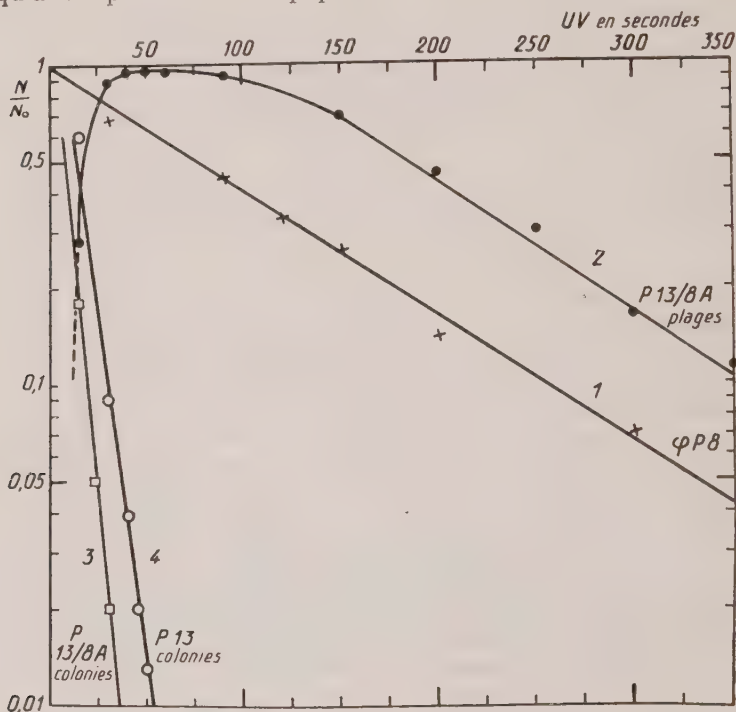


FIG. 3. — Courbes d'induction des bactéries lysogènes (*P 13/8 A* donnant des plages) et de survie du bactériophage (plages de $\phi P 8$), des bactéries lysogènes (colonies de *P 13/8 A*) et des bactéries sensibles (colonies de *P 13*) en fonction de la dose de rayons U.V. La culture est divisée en un certain nombre de fractions. Chaque fraction est irradiée à la distance de 1 m. pendant des durées variables. En ordonnée la fraction induite ou survivante, en coordonnées logarithmiques. En abscisse la dose d'U.V. en secondes.

bactéries lysogènes rendues inaptes par les rayons U.V. à former des colonies sont encore capables de produire des bactériophages. Ceci est comparable à ce que l'on sait [13, 14] des bactéries sensibles rendues inaptes par l'irradiation U.V. à former des colonies, mais capables encore d'adsorber et de reproduire un bactériophage.

Le parallélisme des courbes 1 et 2 semble indiquer que la dis-

parition des centres infectieux formés par les bactéries induites est liée, non à la mort des bactéries, mais à l'inactivation des bactériophages. Ceci conduit à rechercher la présence de bactéries guéries de leur lysogénie parmi celles qui ont survécu à de fortes irradiations. Comme ces bactéries guéries pourraient devenir sensibles à l'action des bactériophages libres, du sérum spécifique antibactériophage a été ajouté au milieu de culture ainsi qu'à la gélose utilisée pour l'étalement des colonies. Quatre-vingt-trois colonies ont été isolées au cours d'expériences où l'irradiation variait de deux cents à mille deux cents secondes (10^{-5} à 10^{-8} survivants). Toutes les colonies étudiées étaient lysogènes. De plus, lorsque des cultures issues de ces bactéries résistantes sont irradiées, les courbes de survie ne diffèrent pas sensiblement de la courbe obtenue avec la culture mère.

II. EFFETS DE LA CARENCE EN ALIMENT CARBONÉ SUR LE DÉVELOPPEMENT DU BACTÉRIOPHAGE. — Après deux heures de jeûne en milieu synthétique non glucosé, une culture de *B. megatherium*

TABLEAU III. — Influence de la carence en glucose sur le développement du bactériophage dans une culture lysogène irradiée.

DURÉE de la carence (en heures)	PLAGES dues aux bactéries induites (0,1 ml à $2,10^{-5}$)				COLONIES formées par les bactéries survivantes (0,1 ml à $2,10^{-2}$)			
	Trouvé			Moyenne	Trouvé			Moyenne
0	71	79	84	78 (1)	418	390	368	392 (1)
1	91	99	102	97	343	365		354
2	92	100	88	93	327	375		352
3	108	72	92	90	429	332		330
4	89	68	99	86	363	309		335
5	103	81	80	88	339	353		346
6	89	73	80	80	368	347		341

(1) Ce résultat, nettement différent des résultats suivants, peut être attribué à l'effet de réversion par étalement sur gélose.

La culture est irradiée pendant 45 secondes à 1 m et agitée à 37° sans source de carbone. A temps variable, on prélève un échantillon que l'on étale sur gélose, après dilutions convenables, avec et sans la souche indicatrice.

soumise au préalable à un rayonnement U. V. ne se lyse plus, ce qui indique une suppression de l'effet inducteur par le jeûne [6]. On a recherché si la carence en glucose provoquait un effet analogue chez *P. pyocyanea* lysogène. Pour cela, une culture irradiée est agitée à 37° sans source de carbone. Toutes les heures, on prélève un échantillon que l'on dilue en milieu

glucosé. Les résultats de cette expérience sont reproduits sur la figure 4 et sur le tableau III. L'examen de la figure 4 montre que :

a) La densité optique de la culture non irradiée privée de substrat carboné se maintient constante. Cette stabilité du témoin

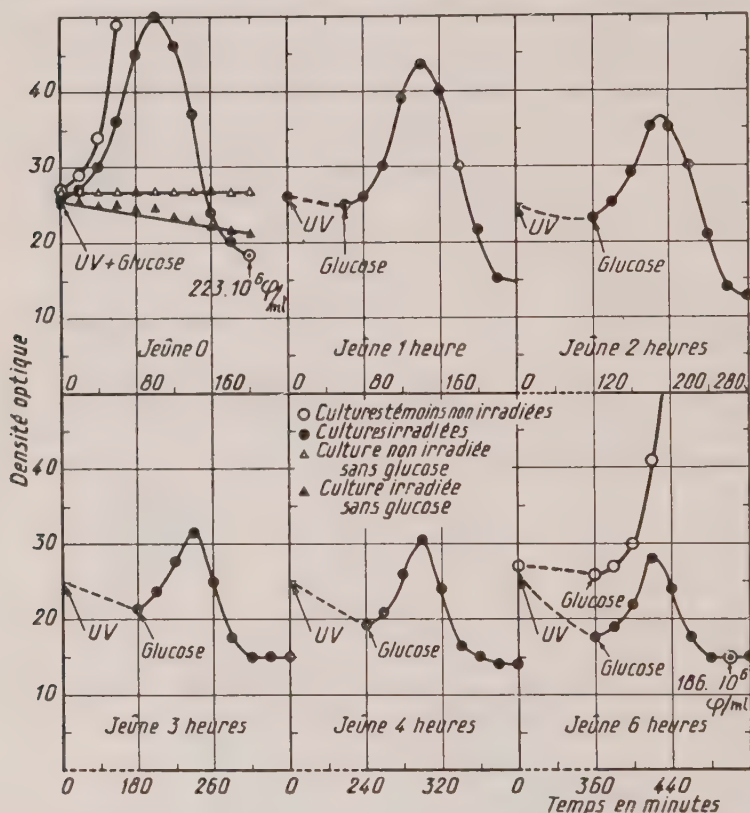


FIG. 4. — Effet de la carence en glucose sur une culture de bactérie lysogène irradiée. La culture, irradiée à temps 0 pendant quarante-cinq secondes à 1 m est agitée à 37° sans source de carbone. Du glucose est ajouté à des échantillons prélevés toutes les heures. En ordonnée la densité optique. En abscisse le temps en minutes.

prouve que la suspension bactérienne est effectivement dépourvue d'aliment carboné utilisable pour la croissance. Après six heures de carence, l'addition de glucose à la culture non irradiée entraîne la reprise immédiate de la croissance exponentielle.

b) Pendant la carence, la densité optique de la culture irradiée subit une baisse lente et progressive. Le tableau III montre que

cette baisse correspond, après six heures de carence, à la disparition d'environ 10 p. 100 des centres infectieux, sans libération de bactériophages. Monod et Wollman [15] ont décrit un phénomène analogue avec *E. coli* infecté par le bactériophage ϕ II. Après six heures de carence, l'addition de glucose à la culture irradiée entraîne la reprise de la croissance, puis la lyse avec libération de bactériophages. Le rendement moyen, mesuré dans une expérience à « cycle unique », était diminué d'environ 25 p. 100 par rapport à la culture témoin non carencée. Les

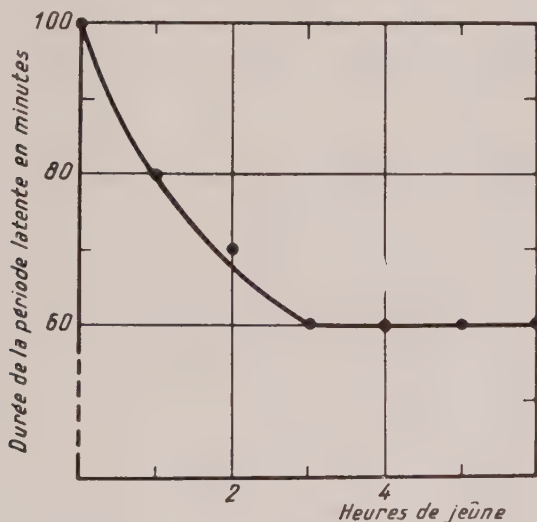


FIG. 5. — Effets de la carence en glucose sur la durée de la phase latente observée pendant le développement des bactériophages chez les bactéries lysogènes irradiées. En ordonnée les durées des phases latentes trouvées au cours de l'expérience représentée par la figure 4. En abscisse la durée de la carence.

bactéries soumises à un jeûne carboné pendant les six heures qui suivent l'irradiation se comportent donc sensiblement comme les bactéries non carencées.

c) La durée de la phase latente et l'importance de la croissance résiduelle diminuent progressivement au cours des premières heures du jeûne (voir fig. 5). Après trois heures de jeûne, la durée de la phase latente est stabilisée aux environs de soixante minutes. Pour expliquer ce résultat, il faut admettre qu'une partie du développement du bactériophage pourrait s'effectuer à vitesse ralentie pendant la période de carence.

III. EFFETS DE LA CARENCE EN GLUCOSE SUR « L'APTITUDE » A L'INDUCTION DES BACTÉRIES LYSOGÈNES. — Contrairement à ce qui

a été observé avec *B. megatherium*, la composition du milieu de culture n'influe pas sur l'aptitude à l'induction des souches lysogènes de *P. pyocyanea*. On a recherché les effets provoqués par la carence en glucose antérieure à l'irradiation.

1° Diminution progressive de l'aptitude avec la durée de la

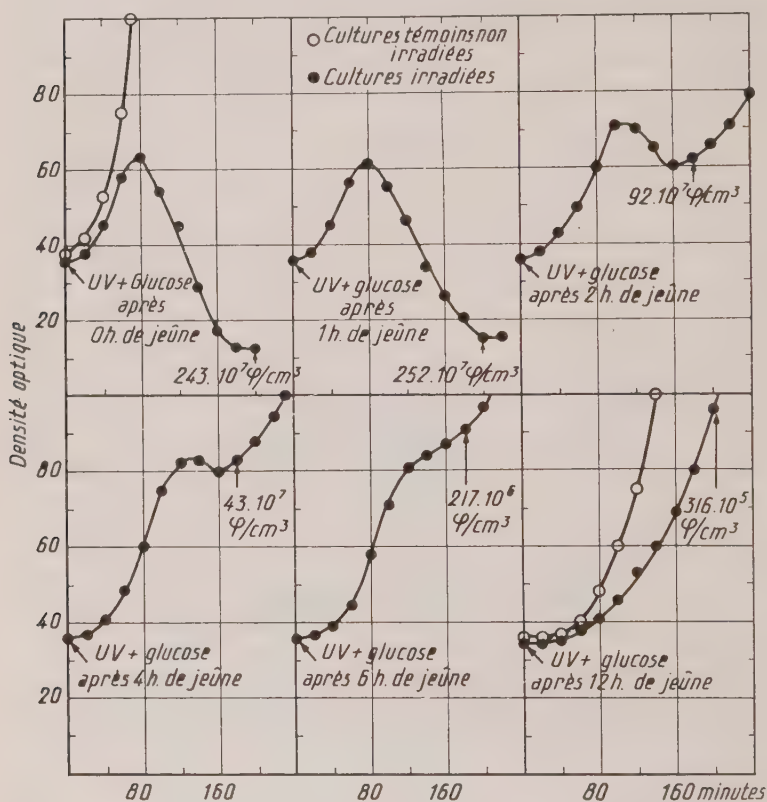


FIG. 6. — Effet de la carence en glucose sur l'aptitude des bactéries lysogène. La culture est carencée en glucose à temps 0. A temps variables, un échantillon est irradié pendant quarante-cinq secondes à 1 m, dilué en milieu neuf glucosé puis agité à 37°. En ordonnée la densité optique. En abscisse le temps en minutes.

carence. — Une suspension de bactéries, carencée en glucose à temps 0 est maintenue à 37° dans un agitateur. Après des carences de durées variables, des échantillons de cette suspension sont irradiés et immédiatement dilués en milieu glucosé. Les résultats de cette expérience sont représentés sur la figure 6. On voit que l'aptitude à la lyse bactériophagique induite diminue

à mesure qu'augmente la durée du jeûne : après deux heures de jeûne, la lyse n'atteint plus que la moitié de la population, et après douze heures, elle ne devient plus mesurable par cette méthode. En même temps, une fraction chaque fois plus importante de la population continue à se développer, comme en témoigne la reprise de croissance après la lyse partielle. Les numérations de bactériophages libres, indiquées sur la figure 6, correspondent à l'intensité de la lyse observée par la mesure de la densité optique.

2° *Influence de la dose d'U. V.* — Pour significative que paraisse l'expérience précédente, les résultats n'en sont pas moins incomplets. D'abord cette expérience a été réalisée avec une dose unique de rayons U. V. correspondant à la dose « optima ». Ensuite les numérations de bactériophages ne permettent pas de faire le départ entre la diminution du nombre des bactéries induites et celle du rendement unitaire moyen. Aussi a-t-on cherché à comparer, en fonction de la dose d'U. V., le nombre des bactéries induites dans une culture carencée d'une part, dans une culture non carencée d'autre part. Il a paru préférable d'irradier la même culture à douze heures d'intervalle plutôt que d'irradier en même temps deux cultures différentes. Les résultats obtenus au cours de plusieurs expériences varient de façon assez notable, en raison des différences existant entre les cultures longtemps carencées. Mais les modifications apportées par la carence au cours d'une même expérience sont significatives. Sur la figure 7 sont reproduits les résultats d'une expérience caractéristique. La fraction des bactéries induites est donnée en fonction de la dose d'U. V., pour les bactéries non carencées (courbe 1) et pour les bactéries carencées (courbe 3). L'examen de la courbe 3 montre que la fraction des bactéries carencées induites augmente avec la dose de rayons U. V. Mais la pente de la courbe est plus petite que dans le cas des bactéries témoins non carencées. Le maximum de la courbe correspond à 11 p. 100 de bactéries carencées induites par une irradiation de cent vingt secondes. Après ce maximum, le nombre des centres infectieux décroît exponentiellement lorsqu'on augmente la dose d'U. V. et ce segment de la courbe est parallèle à la courbe exponentielle de survie des bactériophages libres. On voit sur la figure 7 que :

a) Après douze heures de carence en glucose, seule une petite fraction de la population est induite (ici 11 p. 100 des bactéries viables avant l'irradiation).

b) Les doses requises pour l'induction des bactéries carencées sont beaucoup plus élevées que pour celle des bactéries non carencées. En particulier la dose « optima », qui induit 95 p. 100 des bactéries non carencées, n'induit que 2 p. 100 des bactéries

carencées. Ceci ne contredit pas l'expérience de la figure 6, où la lyse de 2 p. 100 des bactéries pourrait passer inaperçue. Avec la culture carencée, la dose donnant l'effet maximum est environ le double de la dose « optima ».

c) Il est difficile de savoir si le dernier segment de la courbe 3, représentant l'inactivation des bactéries carencées induites, fait

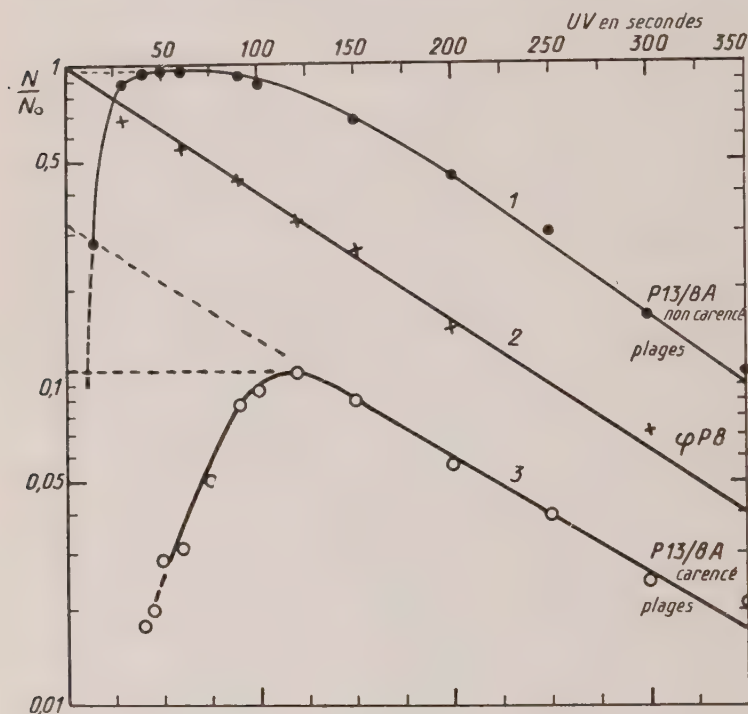


FIG. 7. — Courbes d'induction (plages) des bactéries lysogènes normales et carencées en glucose. La culture est divisée en deux fractions. La première est irradiée avant la carence à la distance de 1 m pendant des durées variables. La seconde est carencée en glucose pendant douze heures, puis irradiée dans les mêmes conditions. En ordonnée la fraction des bactéries induites (ou des bactériophages libres survivants), en coordonnées logarithmiques. En abscisse les doses d'U. V. en secondes.

partie d'une exponentielle ou d'une sigmoïde traduisant un effet multiple, car on ne connaît pas le nombre des bactéries inducibles. Or, on ne peut déterminer la « multiplicité » de l'effet qu'en connaissant la fraction des bactéries inducibles, et inversement. Si le dernier segment de la courbe 3 fait partie d'une sigmoïde représentant un effet d'inactivation « à 3 ou 4 coups »,

la fraction des bactéries inductibles est de 11 p. 100. Si ce segment fait partie d'une exponentielle traduisant un effet d'inactivation « à 1 coup », la fraction des bactéries inductibles est comprise entre 30 et 40 p. 100 — en supposant toutefois que la carence ne provoque pas une hétérogénéité de la population telle que la majorité des individus soient devenus beaucoup plus sensibles à l'effet d'inactivation —. Nos expériences ne permettent donc pas de voir si la carence entraîne une modification dans la multiplicité de l'effet d'inactivation. Elles suggèrent seulement que la fraction des bactéries inductibles diminue après la carence. Les limites de 11 et 40 p. 100, indiquées par l'examen de la figure 7, n'ont rien d'absolu, car elles varient d'une expérience à l'autre.

Comme la dose d'U. V. produisant l'effet maximum est augmentée par la carence de façon significative, il faut admettre que les bactéries carencées inductibles sont plus difficiles à induire que les bactéries normales.

3° *Effets de la carence sur la survie des bactéries lysogènes après irradiation.* — L'incapacité des bactéries lysogènes à former des colonies sur gélose après exposition à un rayonnement U. V. est provoquée par au moins deux causes bien distinctes : d'une part, effet létal direct identique à celui qui intervient dans le cas des bactéries non lysogènes ; d'autre part, effet inducteur. Comme la carence a pour résultat de diminuer l'effet inducteur, elle doit, par là même, augmenter le nombre des bactéries survivantes. C'est ce que montre la figure 8 : les courbes 1 et 2, obtenues au cours de l'expérience précédente, représentent la fraction des bactéries survivantes en fonction de la dose d'U. V., dans la culture non carencée (courbe 1) et dans la culture carencée (courbe 2). Les pentes des deux courbes sont sensiblement différentes. La résistance des bactéries à l'action des U. V. est augmentée de façon significative par la carence en glucose. Pour une dose d'U. V. correspondant à quarante-cinq secondes, l'irradiation laisse 4 survivants sur 100 bactéries carencées au lieu de 4 sur 1 000 bactéries non carencées. La même expérience a été réalisée avec la souche indicatrice P 13 et les résultats sont donnés par les courbes 3 et 4 de la figure 8. On voit que, dans ce cas, les modifications entraînées par la carence sont à peu près nulles.

Il faut remarquer que la résistance à l'action des U. V. de la souche P 13/8 A carencée dépasse celle de la souche P 13 dont elle est dérivée. Il est difficile de proposer une interprétation de ce résultat. Toutefois, bien qu'issue de la souche P 13, la souche P 13/8 A est un mutant et, comme tel, peut présenter une sensibilité à l'irradiation différente de celle de la souche mère, indépendamment de ses propriétés lysogènes.

4° *Variations du rendement unitaire entraînées par la carence*

en glucose. — Les numérations globales de bactériophages libres effectuées après la lyse des cultures ne donnent qu'une idée

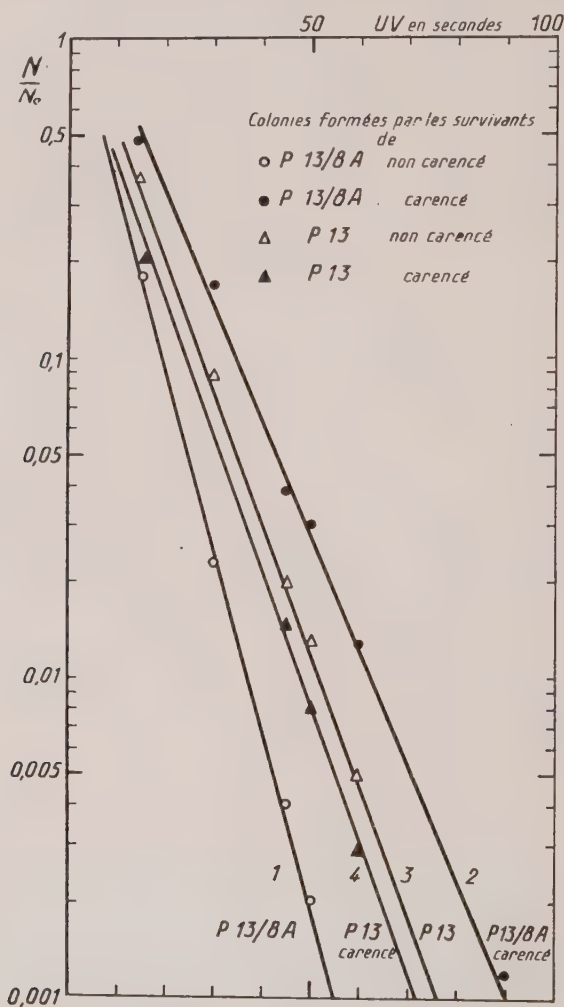


FIG. 8. — Courbe de survie (colonies) des bactéries lysogènes P 13/8'A et des bactéries sensibles P 13 normales et carencées en glucose. Même expérience que sur la figure 7. En ordonnée la fraction des bactéries survivantes en coordonnées logarithmiques. En abscisse les doses d'U. V. en secondes.

approximative du rendement. Celui-ci ne peut être utilement mesuré qu'au moyen d'expériences à « cycle unique ». L'expérience a été réalisée sur la souche lysogène irradiée avec la

même dose de rayons U. V. avant et après carence. A titre comparatif, une expérience analogue a été effectuée sur la souche sensible, infectée avant et après carence. Les résultats sont représentés par les figures 9 et 10. On voit que dans les 2 cas :

a) La durée de la phase latente est prolongée d'environ cinquante minutes par la carence. Ce laps de temps correspond sensiblement à la durée de la phase latente de croissance d'une

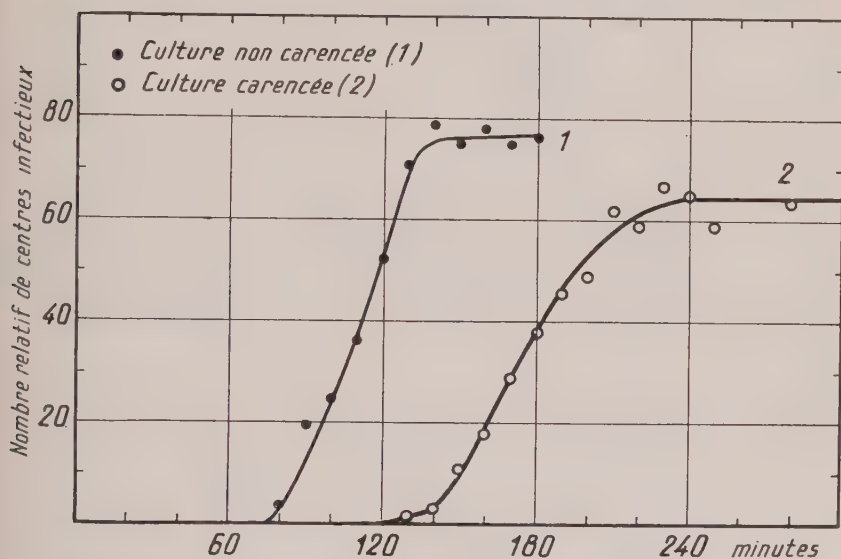


FIG. 9. — Irradiation des bactéries lysogènes normales et carencées. Expérience à « cycle unique ». La culture est divisée en deux fractions. La première est irradiée pendant quatre-vingt-dix secondes à 1 m, avant le début de la carence. La seconde est irradiée dans les mêmes conditions après douze heures de carence. Avec cette dose, on induit environ 90 p. 100 des bactéries normales et 9 p. 100 des bactéries carencées. Les dilutions des tubes de croissance sont choisies en conséquence. En ordonnée le nombre relatif des centres infectieux. En abscisse le temps en minutes.

culture témoin carencée pendant douze heures avant la reprise de la croissance exponentielle.

b) Le rendement unitaire moyen est diminué d'environ 20 p. 100 après la carence.

Dans cette expérience sur les bactéries sensibles carencées, on a constaté, en centrifugeant la culture diluée après adsorption, que la somme des bactériophages libres trouvés dans le surnageant et des centres infectieux provenant du culot était inférieure de 20 p. 100 au nombre de bactériophages ajoutés au début de l'expérience. Comme

avec une multiplicité de 0,1 le nombre des bactéries ayant adsorbé plus d'une particule de bactériophage ne peut pas rendre compte de ce déficit, il faut admettre une inactivation des bactériophages par environ 30 p. 100 des bactéries infectées. Un résultat analogue a été observé avec des bactériophages T_4 et une culture carencée de *E. coli* B [16]. Aucune explication de ce phénomène n'a encore été fournie.

5° *Restauration de l'aptitude chez les bactéries lysogènes carencées.* — Les expériences précédentes montrent que seule une

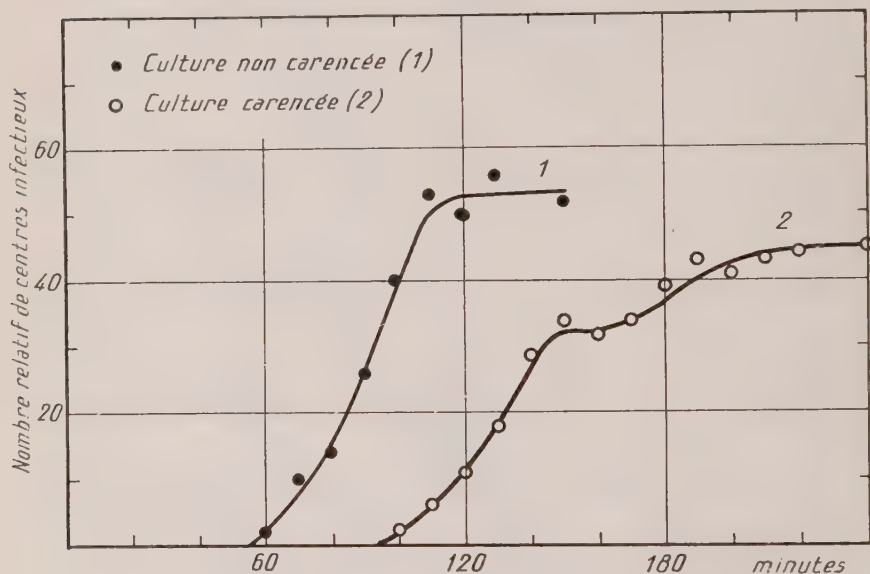


FIG. 10. — Infection des bactéries sensibles normales ou carencées. Expérience à « cycle unique ». La culture est divisée en deux fractions. La première est infectée, avant le début de la carence à raison de un bactériophage pour dix bactéries. La seconde est carencée pendant douze heures, puis infectée dans les mêmes conditions. En ordonnée le nombre relatif des centres infectieux. En abscisse le temps en minutes.

fraction de la population lysogène peut encore être induite après une carence prolongée en glucose. On a donc cherché à savoir si ces bactéries étaient guéries de leur lysogénie par la carence, ou bien si la diminution de l'aptitude était seulement temporaire.

Une suspension de bactéries carencées depuis douze heures reçoit du glucose au temps 0. Après zéro, dix, vingt, trente et quarante minutes, on irradie un échantillon de cette suspension. Les résultats de cette expérience sont représentés sur la figure 11. On voit que l'aptitude à l'induction, presque totalement disparue

sous l'effet de la carence prolongée, réapparaît très rapidement après l'addition de glucose : en quarante minutes la restauration peut être considérée comme complète. Les numérations des bactériophages libres, exprimées sur la figure 11, correspondent aux changements observés dans les courbes de densité optique.

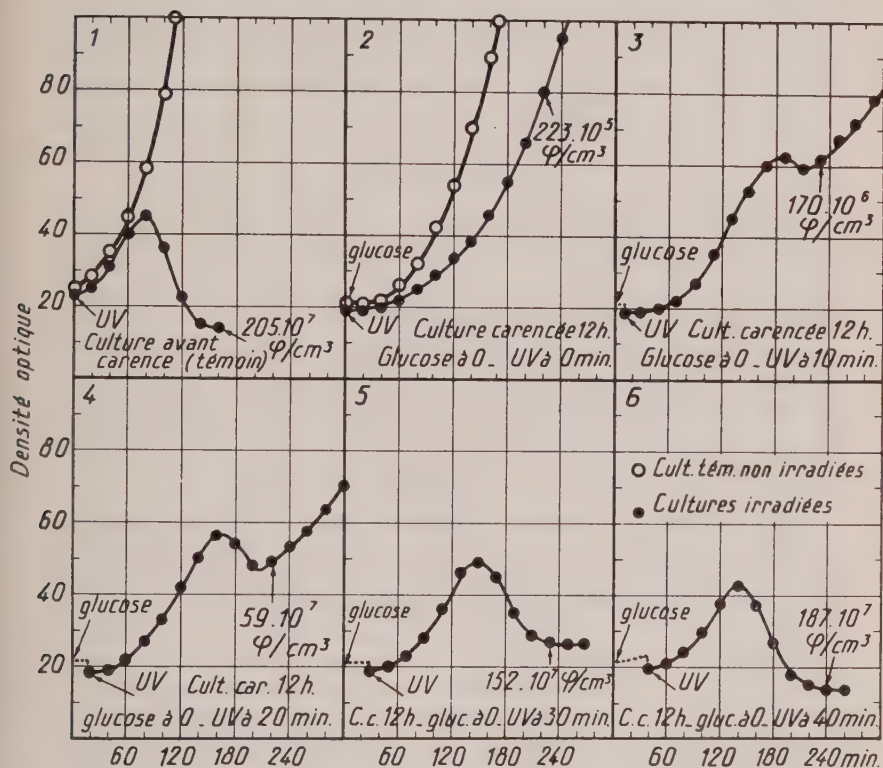


FIG. 11. — *Restauration de l'aptitude chez les bactéries lysogènes carencées en glucose.* La culture de P 13/8 A est carencée en glucose pendant douze heures. On ajoute alors du glucose (temps 0). A 0, 10, 20, 30 et 40 min. on irradie un échantillon pendant quarante-cinq secondes à 1 m . La courbe 1 est un témoin irradié avant la carence. En ordonnée la densité optique. En abscisse le temps en minutes.

La courbe représentant la fraction des bactéries induites en fonction de la dose d'U. V. est redevenue normale après ce séjour de quarante minutes en glucose.

La carence en aliment carboné ne supprime donc pas la lyso-génie d'une fraction importante des bactéries. Toutefois, il était intéressant de rechercher la présence de quelques bactéries

guéries. C'est parmi les bactéries carencées ayant survécu à de fortes irradiations qu'on a le plus de chances de trouver des bactéries non lysogènes. Pour éviter une infection éventuelle de ces bactéries par les bactériophages libres, du sérum anti-bactériophage a été ajouté au milieu de culture et à la gélose utilisée pour l'étalement : les 47 colonies isolées étaient lysogènes. Une expérience analogue réalisée avec la souche P 8 a donné le même résultat. Ces faits sont insuffisants pour affirmer que la carence en glucose ne permet pas la guérison de quelques bactéries lysogènes. Mais si ce phénomène existe, il est rare.

DISCUSSION.

1° La carence en glucose réalisée *après* l'irradiation des bactéries lysogènes provoque des effets différents selon les espèces bactériennes. Elle diminue l'effet inducteur chez *B. megatherium*. Chez *P. pyocyanea*, elle arrête temporairement le développement du bactériophage qui reprend lors d'une addition ultérieure de glucose. Pourtant, l'effet inducteur peut être modifié chez *P. pyocyanea* pendant une grande partie de la période latente soit par exposition à la lumière visible [3], soit par étalement sur gélose, soit encore par transfert en bouillon de bactéries irradiées en milieu synthétique (expériences inédites).

2° La carence en glucose réalisée *avant* l'irradiation modifie « l'aptitude » des bactéries lysogènes à l'induction. On peut actuellement admettre que l'existence même des bactéries lysogènes est liée à un équilibre établi entre la bactérie et le « probactériophage » [4]. Sous l'influence d'un choc inducteur, cet équilibre est susceptible de se rompre en faveur du probactériophage, à condition toutefois que le complexe bactérie-probactériophage se trouve dans un état donné lorsqu'il est exposé à l'agent inducteur. Cet état est l'aptitude à l'induction. La diminution de l'aptitude sous l'effet de la carence semble être un phénomène assez général parmi les bactéries lysogènes inductibles par un rayonnement U. V. Il a été observé sur la souche 899 de *B. megatherium* après quelques heures de carence en glucose [6], sur la souche K 12 de *E. coli* après un séjour d'une nuit dans un tampon [47] et sur la souche Y 87, mutant de *E. coli* K 12, déficient en biotine et en méthionine, après trois heures de carence en méthionine [48]. Le problème qui se pose alors est celui du mode d'action de la carence. On a déjà remarqué la complexité des effets produits par les rayons U. V. sur les bactéries lysogènes. Les courbes donnant le nombre des bactéries induites en fonction de la dose sont les résultantes d'au moins trois effets différents : effet létal direct sur les bactéries, effet inducteur, inactivation des particules infectieuses. Dans le

segment de ces courbes correspondant à la persistance des centres infectieux formés par les bactéries induites, un point a été précisé grâce aux résultats obtenus avec *E. coli* K 12 [2] puis retrouvés sur *P. pyocyanea* : l'effet des rayons U. V. semble lié à l'inactivation, non des bactéries, mais des bactériophages. La carence n'affecte pas la pente de ce segment de courbe. Si toutefois elle entraîne une modification dans la multiplicité de l'effet inactivateur, nos expériences ne permettent pas de la déceler.

Dans le segment de ces courbes correspondant à l'induction, les deux principales modifications, apportées par la carence semblent être la diminution du nombre des bactéries inductibles et la diminution de la sensibilité des bactéries inductibles à l'égard de l'effet inducteur des U. V. Il est possible que ces deux effets représentent les expressions d'un même phénomène. Pour la commodité de la discussion, nous appellerons « médiateurs » l'ensemble des éléments qui interviennent dans le développement du probactériophage en bactériophage pathogène, c'est-à-dire : les récepteurs sur lesquels agissent les agents inducteurs, le ou les systèmes enzymatiques qui interviennent dans la réaction probactériophage \rightarrow bactériophage et enfin le probactériophage lui-même. C'est là une conception schématique qui ne préjuge en rien de la nature et de l'individualité des éléments ainsi séparés. On peut admettre que la teneur en médiateurs est répartie dans les bactéries normales selon une distribution continue et suffisamment homogène pour que l'ensemble de la population soit aisément inductible. La carence pourrait modifier la teneur en l'un de ces médiateurs de façon telle qu'elle soit alors répartie dans les bactéries selon une nouvelle distribution continue. La fraction des bactéries carencées dont la teneur en ce médiateur serait inférieure (ou supérieure s'il s'agit d'un inhibiteur) à une certaine valeur critique ne serait plus inductible, sinon, ce qui est à peu près équivalent, par des doses considérables d'U. V. Les autres bactéries seraient encore inductibles, mais par des doses d'U. V. en rapport avec leurs teneurs en médiateur, c'est-à-dire par des doses plus fortes que les bactéries normales. Après addition de glucose, la reconstitution des systèmes enzymatiques et des constituants bactériens entraînerait la restauration des médiateurs, donc de l'aptitude dans l'ensemble de la population. Ceci expliquerait le fait que la période nécessaire à la restauration de l'aptitude est sensiblement égale à la durée de la phase latente qui précède la reprise de la croissance exponentielle dans les cultures témoins. L'aptitude ne doit donc pas être considérée comme une propriété absolue d'un système bactérie-probactériophage. Sous l'effet des conditions de culture, elle est susceptible de variations continues.

Cette hypothèse est en accord avec certains résultats obtenus

chez d'autres espèces lysogènes. Avec *B. megatherium*, les bactéries peuvent être induites par un rayonnement X et non par un rayonnement U. V. lorsqu'elles sont cultivées en bouillon Difco [19]. Dans certains extraits de levure les bactéries peuvent être induites par les rayons U. V. et par les réducteurs, alors qu'avec d'autres extraits de levure, les rayons U. V. seuls sont actifs [20]. L'aptitude ne doit donc être envisagée que par rapport à un inducteur donné, dans des circonstances déterminées.

RÉSUMÉ.

1° Les cultures provenant de trois souches lysogènes de *Pseudomonas pyocyanea* se lysent totalement après irradiation par un rayonnement U. V., mais un faible pourcentage de bactéries produit des bactériophages.

2° En étalant des bactéries sensibles avec un excès de bactériophages provenant d'une culture lysogène, on obtient des clones résistants dont beaucoup sont eux-mêmes lysogènes. Ces lysogènes artificiels montrent un comportement variable après irradiation par un rayonnement U. V. La proportion des bactéries qui produisent du bactériophage diffère considérablement suivant les clones. Les recherches ont porté sur la souche donnant la proportion la plus élevée de bactéries inductibles (95 p. 100).

3° Des bactéries irradiées puis soumises à une carence en glucose ne se lysent pas, mais les effets de l'irradiation persistent : après addition de glucose les bactéries produisent des bactériophages et se lysent.

4° L'aptitude d'une culture à l'induction par les rayons U. V. est fortement diminuée par une carence en glucose antérieure à l'irradiation. La dose produisant l'effet inducteur maximum est plus élevée pour les bactéries carencées que pour les bactéries non carencées. Seule une petite fraction de la population carencée peut être induite. Le rendement unitaire des bactéries induites n'est que peu diminué par la carence. Le nombre des bactéries survivant à l'irradiation est augmenté de façon significative par la carence.

5° Après douze heures de carence en glucose, l'aptitude des bactéries à l'induction par les rayons U. V. est entièrement restaurée par un séjour de quarante minutes en milieu glucosé. Cette période correspond à la durée de la phase latente qui précède la reprise de la croissance exponentielle d'une culture témoin carencée pendant douze heures.

6° Parmi les bactéries, carencées ou non, qui ont survécu à de fortes irradiations, on n'a pas trouvé de bactéries guéries de leur lysogénie.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et N. KJELDGAARD. *Ces Annales*, 1950, **79**, 1-45.
- [2] J. WEIGLE et M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1951, **62**, 301-318.
- [3] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **231**, 1585-1587.
- [4] G. BERTANI. *J. Bact.*, 1951, **62**, 293-300.
- [5] H. IONESCO. *C. R. Acad. Sci.*, sous presse.
- [6] A. LWOFF. *Ces Annales*, 1951, **4**, 370-388.
- [7] E. L. ELLIS et M. DELBRÜCK. *J. Gen. Physiol.*, 1939, **22**, 365.
- [8] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1780-1782.
- [9] J. MONOD. *Ann. Rev. Microb.*, 1949, **3**, 371-394.
- [10] R. LATARJET. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1713-1715.
- [11] F. BURNET. *Brit. J. exp. Path.*, 1929, **10**, 109-114.
- [12] M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1945, **50**, 131-135.
- [13] M. ROUYER et R. LATARJET. *Ces Annales*, 1946, **72**, 89-94.
- [14] T. F. ANDERSON. *J. Bact.*, 1948, **56**, 403-410.
- [15] J. MONOD et E. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1947, **73**, 937-957.
- [16] E. WOLLMAN et G. STENT. *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, **6**, 292-306.
- [17] J. WEIGLE. Communication personnelle.
- [18] E. BOREK. *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- [19] R. LATARJET. *Ces Annales*, 1951, **4**, 389-393.
- [20] A. LWOFF et L. SIMINOVITCH. *Ces Annales*, sous presse.

N. B. — Pour unifier la terminologie des souches lysogènes, il a été décidé d'utiliser le système de notation de W. Smith (*J. Gen. Microb.*, 1951, **5**, 458). Dans ce système, le symbole désignant le phage est placé entre parenthèses à la suite du symbole désignant la souche bactérienne. C'est ainsi que la souche désignée par 13/8 A dans ce mémoire sera représentée à l'avenir par 13 (8) A.

RECHERCHES BIOCHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES SUR LES FRACTIONS POLYOSIDIQUES DE *CL. BIFERMENTANS* ET DE *CL. SORDELLII*

par P. TARDIEUX et B. NISMAN.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies, Paris-Garches.)

La dualité des espèces *Cl. bifermentans* et *Cl. sordellii* a été soutenue par Prévot et Cordier en 1941 [1], alors que Clark et Hall [2] les considèrent comme étroitement parentes et que Stewart [3], puis Breed, Murray et Hitchens [4] les estiment identiques. Il nous a paru intéressant de rechercher si l'étude de fractions polyosidiques spécifiques, extraites des corps microbiens, pourrait révéler de nouveaux faits concernant leur parenté immunochimique.

L'expérimentation a été conduite dans ce but à partir des souches historiques « TM » de *Cl. bifermentans* (isolée par Tissier et Martelly) et « 82 » de *Cl. sordellii* (isolée par Sordelli), empruntées à la collection du Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur.

I. — EXTRACTION ET COMPOSITION DES FRACTIONS POLYOSIDIQUES.

La méthode utilisée dans ce travail est essentiellement celle de Julianelle et Wieghard [5], et de Webb [6], consistant dans l'extraction par la soude diluée de corps microbiens provenant de cultures de dix-huit heures en milieu VF glucosé à 1 p. 100.

Les bactéries sont centrifugées, lavées une fois à l'eau, mises en contact avec NaOH 0,05 N (200 ml pour 40 l de culture) et incubées à 60° pendant seize à dix-huit heures. On centrifuge à nouveau, on recueille le surnageant que l'on amène à pH 3,5 par CH_3COOH 5N. Le précipité formé est éliminé par centrifugation. La fraction polyosidique est alors précipitée par 4 volumes d'éthanol, puis purifiée par fractionnements répétés, avec de l'acide trichloracétique à 50 p. 100 (concentration finale 10 p. 100), et précipitation du surnageant par l'éthanol à 95 p. 100, jusqu'à ce qu'il n'apparaisse plus de précipité par l'acide trichloracétique. Finalement les extraits sont dialysés contre l'eau courante, préci-

pités par 5 volumes d'éthanol à 95 p. 100 et lavés plusieurs fois à l'éthanol puis à l'éther.

L'extraction de 40 l de *Cl. sordellii* a fourni finalement environ 800 mg de produit, contenant 2,5 p. 100 de N et 0,5 p. 100 de P.

40 l de culture de *Cl. bifementans* ont fourni 560 mg d'un produit contenant 4,1 p. 100 de N.

Le pouvoir réducteur total a été estimé par la microméthode de Hagedorn-Jensen. Des échantillons exactement pesés (prises entre 2,5 et 5 mg) ont été soumis à l'hydrolyse par $\text{SO}_4\text{H}^2 2\text{N}$ au bain-marie à 100° pendant six heures. Le pouvoir réducteur total exprimé en grammes de glucose pour 100 g d'extrait sec est :

Pour l'extrait de <i>Cl. sordellii</i>	38,7 g
Pour l'extrait de <i>Cl. bifementans</i>	45,6 g

Nous avons effectué la chromatographie des extraits, hydrolysés par $\text{SO}_4\text{H}^2 \frac{\text{N}}{\text{I}}$ pendant quatre et dix heures, suivant la technique unidimensionnelle de Partridge [7], en nous servant de lutidine saturée en H_2O et de (pyridine + acétate d'éthyle + H_2O) comme solvants, avec, pour révélateur, le phtalate d'aniline [8].

De cette manière, nous avons constaté la présence des sucres suivants :

<i>Cl. bifementans</i> T.M.	{ Acide hexuronique. Glucose. Hexosamine.
<i>Cl. sordellii</i> 82.	{ Acide hexuronique. Glucose. Hexosamine.

Nous avons, en outre, effectué le dosage du glucose par la méthode très spécifique de Keilin et Hartree [9] à la notatine et en présence de nitrure de sodium pour inhiber la catalase, suivant Monod [10]. Les taux obtenus sont :

<i>Cl. bifementans</i> . . .	11,8 p. 100 de glucose dans l'extrait brut.
<i>Cl. sordellii</i>	17,5 p. 100 de glucose dans l'extrait brut.

Si l'on rapporte ces chiffres au pouvoir réducteur total, on obtient :

Pour <i>Cl. bifementans</i> . . .	29,8 p. 100 du pouvoir réducteur total.
Pour <i>Cl. sordellii</i>	38,3 p. 100 du pouvoir réducteur total.

La caractérisation de l'hexosamine a été effectuée par la réaction de Elson et Morgan [11]. Les recherches ultérieures tendront à préciser sa nature exacte, ainsi que celle de l'acide hexuronique.

Les résultats acquis indiquent toutefois que les extraits considérés, quoique non précipitables par l'acide trichloracétique à 50 p. 100, contiennent encore des constituants de nature autre que polyosidique.

II. — PRÉPARATION DES IMMUNSÉRUMS.

1° *Cl. bifementans*. — Quatre lapins ont reçu par voie veineuse des doses croissantes de suspensions préparées à partir de corps microbiens lavés et desséchés par l'acétone à froid, après vingt-quatre heures de culture à 37° en milieu VF. Avant chaque injection, la dose convenable était reprise en eau physiologique et agitée jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Chaque animal reçut six injections à raison de deux par semaine, la première dose étant 8 mg et la dernière 35 mg. Sept jours après celle-ci, le sérum fut recueilli par saignée.

Les différents sérums, éprouvés dans les mêmes conditions, ont montré vis-à-vis des microbes frais et vis-à-vis des extraits un pouvoir agglutinant et un pouvoir précipitant sensiblement analogues.

2° *Cl. sordellii*. — L'obtention d'immunsérums anti-*sordellii* est rendue difficile par le pouvoir toxigène de ce microbe. Nous avons tenté de l'atténuer par action de la chaleur et par action du formol.

Le chauffage des corps microbiens nous a donné de médiocres résultats. L'atténuation par le formol a permis, au contraire, d'obtenir un sérum actif, par injection intraveineuse au lapin de doses croissantes de corps microbiens laissés vingt-quatre heures à 37° au contact de formol au taux de 1 p. 100, puis lavés et repris en eau physiologique.

Les animaux ont été saignés après avoir reçu sept injections, la dernière dose équivalant à 10 cm³ de culture de dix-huit heures à 37°.

III. — ÉPREUVES SÉROLOGIQUES.

A. VÉRIFICATION DU POUVOIR AGGLUTINANT DES IMMUNSÉRUMS :

Le sérum anti- <i>bifementans</i>	{	agglutine <i>Cl. bifementans</i> jusqu'à
		la dilution de 1/3 000
		n'agglutine pas <i>Cl. sordellii</i> .
Le sérum anti- <i>sordellii</i>	{	agglutine <i>Cl. sordellii</i> jusqu'à la
		dilution de 1/25 000
		n'agglutine pas <i>Cl. bifementans</i> .

B. ÉPREUVES DE PRÉCIPITATION. — Divers essais préliminaires nous ont montré que le pouvoir précipitant des immunsérums vis-à-vis des extraits étudiés est objectivé de la façon la plus nette

par le test de précipitation à l'interface. C'est donc cette méthode que nous avons employée couramment.

Nous donnons ci-après les résultats des précipitations observées en mettant en présence des dilutions de chaque sérum et des solutions à taux décroissant des extraits polysidiques.

1° Sérum anti-bifermentans.

DILUTIONS de sérum	SOLUTIONS d'extrait de <i>Cl. bifermentans</i> (concentration en mg/cm ³)							SOLUTIONS d'extrait de <i>Cl. sordellii</i> (concentration en mg/cm ³)						
	10	10/3	1	1/3	1/10	1/30	1/100	10	10/3	1	1/3	1/10	1/30	1/100
1/1	+	+	+	+	+	+	±	Aucune précipitation. Aucune précipitation. Aucune précipitation. Aucune précipitation. Aucune précipitation. Aucune précipitation. Aucune précipitation.						
1/2,5	+	+	+	+	+	+	±							
1/5	±	+	+	+	+	+	±							
1/10	op	op	+	+	+	+	±							
1/25	op.	op.	op.	±	+	+	±							
1/50	0	0	0	0	0	0	0							
1/100	0	0	0	0	0	0	0							

2° Sérum anti-sordellii.

DILUTIONS de sérum	SOLUTIONS d'extrait de <i>Cl. bifermentans</i> (concentration en mg/cm ³)							SOLUTIONS d'extrait de <i>Cl. sordellii</i> (concentration en mg/cm ³)						
	10	10/3	1	1/3	1/10	1/30	1/100	10	10/3	1	1/3	1/10	1/30	1/100
1/1	+	+	+	+	+	±	0	+	+	+	+	+	±	0
1/2,5	+	+	+	+	+	±	0	+	+	+	+	+	±	0
1/5	+	+	+	+	+	±	0	+	+	+	+	+	±	0
1/10	±	+	+	+	+	±	0	+	+	+	+	+	±	0
1/25	op.	op.	+	+	+	±	0	op.	±	+	+	+	±	0
1/50	op.	op.	op.	+	+	±	0	op.	op.	±	+	+	±	0
1/100	0	0	0	±	±	0	0	0	0	0	0	±	0	0

Le signe + indique l'apparition d'un anneau de précipité. Le signe 0 indique l'absence de toute réaction. Le signe ± indique une réaction douteuse. La mention op. traduit l'apparition d'une opalescence diffuse dans toute la couche de sérum sans formation d'anneau.

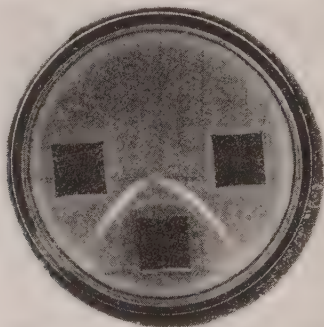
Plusieurs échantillons de ce sérum anti-sordellii ont été soumis à une épreuve d'épuisement des précipitines par l'extrait hétérologue dans les conditions suivantes : le sérum pur a été mis en présence d'extrait de *Cl. bifermentans*, à raison de 1 cm³ pour 10 mg (poids sec) d'extrait, humecté d'eau physiologique. Après

agitation on a porté à 37° pendant deux heures, puis à 4° pendant quarante-huit heures et l'on a centrifugé.

Ce sérum ainsi épuisé, et vérifié inactif vis-à-vis de l'extrait de *Cl. bifermentans*, s'est montré également dépourvu de tout pouvoir précipitant vis-à-vis de l'extrait homologue de *Cl. sordellii*.

On a pu vérifier, par contre, que le pouvoir agglutinant vis-à-vis des corps microbiens frais de *Cl. sordellii* n'était nullement modifié. Il ne l'est pas davantage lorsque l'épuisement est pratiqué non avec l'extrait hétérologue, mais avec l'extrait homologue.

C. Ces faits nous ont incités à contrôler les tests de précipi-



tation à l'aide des méthodes d'analyse immuno-chimique par diffusion en milieu gélifié.

La méthode de Oudin [12], en tubes contenant l'immunsérum gélosé dans lequel on fait diffuser l'antigène, a confirmé les résultats précédents :

Dans une couche gélifiée de sérum anti-*bifermentans*, la diffusion de l'extrait homologue donne une zone d'opalescence qui ne présente qu'un maximum, celui-ci s'éloignant progressivement de l'interface ; la diffusion de l'extrait hétérologue ne donne rien.

Dans une couche gélifiée de sérum anti-*sordellii*, la diffusion de l'un ou l'autre des deux extraits provoque l'apparition d'une zone opalescente analogue pour l'un et pour l'autre. L'aspect de cette zone semble indiquer la présence dans chaque extrait de deux constituants.

Si l'immunsérum anti-*sordellii* a été préalablement épuisé par l'extrait de *Cl. bifermentans*, ni celui-ci ni l'extrait de *Cl. sordellii* ne peuvent provoquer, par leur diffusion, de zone d'opalescence.

La méthode de Ouchterlony sur boîte de Petri [43] apporte une confirmation supplémentaire de l'identité de comportement des deux extraits vis-à-vis du sérum anti-*sordellii*. Comme le montre la figure 1, celui-ci, diffusant à la rencontre des extraits contenus dans des logettes disposées en équerre par rapport à la logette de sérum, donne une zone de précipitation avec chacun, et les deux zones se rejoignent pour former une ligne continue comme celle que l'on observerait si les deux extraits étaient identiques.

Nous remercions vivement M. J. Oudin qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous guider dans la mise en œuvre et l'interprétation de ces techniques.

IV. — CONCLUSIONS.

Les épreuves pratiquées montrent que l'on a pu extraire des corps microbiens de *Cl. bifermentans* et *Cl. sordellii* des fractions polyosidiques réagissant spécifiquement avec les immun-sérum homologues jusqu'à de hautes dilutions.

Au point de vue chimique, les glucides simples qui les constituent semblent être de même nature dans les deux cas. Ils diffèrent des sucres d'un polyoside spécifique extrait d'un autre anaérobie, *Welchia perfringens*, où l'on ne constate pas la présence d'acide hexuronique.

L'intérêt des tests sérologiques réside dans le fait que les réactions sont croisées dans un sens et non dans l'autre : l'immun-sérum anti-*bifermentans* réagit seulement avec l'extrait homologue et nullement avec l'extrait de *Cl. sordellii* ; au-contre, l'immun-sérum anti-*sordellii* réagit également avec l'extrait homologue et l'extrait hétérologue, et son épuisement par celui-ci le rend inactif vis-à-vis de l'extrait homologue.

On peut en conclure que les fractions polyosidiques extraites de *Cl. bifermentans* et de *Cl. sordellii* présentent une parenté immunologique très grande, mais sont néanmoins distinctes ; ceci vient s'ajouter aux quatre ordres de faits différents qui ont permis à Prévot et Cordier de soutenir la thèse de la dualité.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.-R. PRÉVOT et P. CORDIER. *Ces Annales*, 1941, **67**, 473.
- [2] F. E. CLARK et I. C. HALL. *J. Bact.*, 1937, **33**, 23.
- [3] S. STEWART. *J. Bact.*, 1938, **35**, 13.
- [4] R. S. BREED, E. G. D. MURREY et A. P. HITCHENS (*in* 5^e éd. *Bergey's Manual*).
- [5] Ph. D. JULIANELLE et C. W. WIEGHARD. *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 23.
- [6] M. WEBB. *J. gén. Microbiol.*, 1948, **2**, 260.

- [7] S. M. PARTRIDGE. *Biochim. J.*, 1948, **42**, 238, 251.
- [8] S. M. PARTRIDGE. *Nature*, 1949, **164**, 443.
- [9] D. KEILIN et E. F. HARTREE. *Biochim. J.*, 1948, **42**, 230.
- [10] J. MONOD et A. M. TORRIANI. *Ces Annales*, 1950, **78**, 65.
- [11] W. T. J. MORGAN et L. A. EYSON. *Biochim. J.*, 1933, **27**, 1824.
- [12] J. OUDIN. Thèse Sciences, Paris, 1949.
- [13] O. OUCHTERLONY. *Ark. f. Kem. Miner. o. Geol.*, Stockholm, 1948, **25**, 186.

RECHERCHES SUR LES AGGLUTININES HÉTÉROLOGUES DES SÉRUMS ANTISTAPHYLOCOCCIQUES

I. — UTILISATION D'UNE MÉTHODE D'ABSORPTION QUANTITATIVE

par J. PILLET, P. MERCIER et B. ORTA (*).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

L'étude des composants antigéniques de surface des staphylocoques, par la technique de l'agglutination spécifique à l'aide de sérums absorbés, montre que seule une méthode d'absorption quantitative peut permettre d'approfondir actuellement cette question.

C'est pourquoi nous avons mis au point une technique d'absorption par les germes tués et desséchés, grâce à laquelle il devient possible de comparer, à côté du type sérologique et des caractères biologiques des souches absorbantes, les poids des germes employés pour réaliser une absorption déterminée.

On peut alors étudier avec une assez grande précision le pouvoir absorbant des différentes souches, ce qui doit permettre d'obtenir des renseignements sur la surface de ces germes, le pouvoir absorbant semblant être en effet une propriété caractéristique de cette surface.

En effet, le pouvoir absorbant, variable d'une souche à l'autre, paraît constant pour une même souche, est spécifique et, assez paradoxalement, ne semble pas fonction de la richesse en agglutinogènes correspondants. Il varie, par ailleurs, avec la composition du milieu de culture dans lequel s'est développé le germe, mais reste constant lorsque l'on utilise le même milieu.

Il s'agit ici du pouvoir absorbant vis-à-vis des agglutinines hétérologues, c'est-à-dire de celles qui entraînent l'agglutination des souches de types différents de celui de la souche utilisée comme antigène. L'absorption des agglutinines homologues semble s'effectuer, en effet, selon des modalités différentes et pose par conséquent d'autres problèmes qui seront étudiés ultérieurement.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 décembre 1951.

Nous décrirons dans cette note :

- 1° La préparation des germes tués et desséchés ;
- 2° L'étude comparée des propriétés absorbantes des germes vivants d'une part, tués et desséchés d'autre part ;
- 3° Une première application de cette technique à la question de l'absorption des agglutinines hétérologues.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

a) La *préparation des sérums* et la technique d'agglutination sur lame ont été décrites antérieurement [1, 2]. Nous y avons apporté, toutefois, les modifications suivantes : les sérums ont été dilués soit au 1/50, soit au 1/100 avant absorption, la durée de l'absorption a été limitée à quinze minutes et la lecture des agglutinations a été effectuée après quinze minutes d'agitation modérée.

Les souches employées ont été les souches types I, II, III et quelques-unes des souches proposées comme types 4, 5, 6, 7, 8, 9 par Christie et Keogh [3]. L'étude sérologique détaillée de ces dernières souches fera l'objet d'une prochaine communication.

b) *Préparation des germes desséchés.* — Cette préparation comporte les opérations suivantes :

Ensemencement en boîtes de Roux sur milieu A gélosé [2], étuve à 37° pendant dix-huit heures.

Addition de 15 cm³ d'eau distillée par boîte et récolte des germes, suivie d'une première centrifugation.

Emulsion des germes en eau distillée, répartition en tubes à essai et chauffage sept minutes à 100° (vérification de la stérilité).

Addition d'eau distillée et seconde centrifugation.

Répartition du culot en boîtes de Petri. Etuve à 37° pendant dix-huit heures.

Récupération des germes secs et broyage au mortier.

POUVOIR ABSORBANT COMPARÉ DES GERMES VIVANTS ET DES GERMES TUÉS ET DESSÉCHÉS.

La méthode de préparation des germes desséchés décrite plus haut est celle que nous employons maintenant habituellement. Il y avait lieu de rechercher, avant de l'adopter définitivement, si les divers traitements subis par les germes ne modifiaient pas leur pouvoir absorbant et, pour cela, de nombreux essais préliminaires ont été réalisés de la façon suivante :

Après la récolte des germes, ceux-ci ont été divisés en deux parties égales dont l'une a été traitée comme précédemment,

alors qu'avec l'autre les lavages ont été effectués à l'eau physiologique et les germes n'ont été ni chauffés, ni desséchés.

Les germes provenant des deux préparations ont été émulsionnés dans des quantités égales d'eau physiologique et c'est à l'aide de ces deux émulsions que nous avons effectué des absorptions comparatives. Cette recherche a été faite avec chacune des souches employées et nous ne donnerons ici qu'un exemple des résultats obtenus.

Il s'agit, dans ce cas, du sérum anti-III dilué au 1/100 que l'on absorbe par des quantités égales de germes I.

NOMBRE d'absorptions	GERMES utilisés	AGGLUTINATIONS A L'AIDE DES SOUCHES		
		I	II	III
0.		++++	++++	++++
1.	Desséchés.	0	+++	++++
	Vivants.	0	++	++++
2.	Desséchés.	0	++	++++
	Vivants.	0	±	++++
3.	Desséchés.	0	0	++++
	Vivants.	0	0	+++ ±

Les résultats précédents montrent que les germes tués et desséchés conservent un pouvoir absorbant sensiblement comparable, bien qu'un peu inférieur à celui des germes vivants. On enregistre généralement, quelle que soit la souche, une faible diminution du pouvoir absorbant, qui peut être due aux conditions expérimentales. Toutefois, cette variation du pouvoir absorbant est toujours très faible et ne modifie en rien les résultats du point de vue qualitatif.

C'est pourquoi, sous réserve que cette épreuve comparative soit effectuée avec chaque souche utilisée, nous pensons que l'on peut employer, sans risque d'erreur notable, les germes tués et desséchés pour l'absorption des sérums antistaphylococciques. Un second point important à préciser était de rechercher si différentes préparations de germes d'une même souche, recueillis sur les mêmes milieux à des intervalles éloignés, étaient identiques du point de vue de l'absorption. L'étude des résultats d'expériences du même type, faites il y a un an, nous avait tout d'abord montré que le pouvoir absorbant des souches types I, II, III était très voisin de celui observé avec les préparations actuelles.

Nous avons précisé ces résultats en mesurant le pouvoir absorbant de 3 préparations de germes desséchés faites à un mois d'intervalle avec chacune des souches. Le pouvoir absorbant s'est

montré sensiblement constant pour chacune des préparations testées.

Il y a lieu de noter toutefois que les résultats ne sont constants que si l'on cultive les germes sur un même milieu. En effet, le pouvoir absorbant comme la production d'agglutinogènes semble, chez les staphylocoques, nettement influencé par la composition du milieu de culture. C'est ainsi qu'avec la souche III il faut, pour réaliser une absorption identique du sérum I :

10 mg de germes III cultivés sur milieu A ;

95 mg de germes III cultivés sur milieu C (eau peptonée glucosée [2]).

Bien que nous n'ayons pas fait une étude systématique des variations du pouvoir absorbant suivant le milieu de culture, ce dernier résultat, joint à quelques autres, montre clairement qu'il y a lieu d'employer dans ces expériences un milieu de composition aussi constante que possible.

L'utilisation des germes tués et desséchés pour l'absorption des sérums antistaphylococciques nous semblant justifiée par les résultats précédents, nous avons, en utilisant cette technique, abordé l'étude de l'absorption des agglutinines hétérologues.

ABSORPTION DES AGGLUTININES HÉTÉROLOGUES.

Nous nous sommes préoccupés en premier lieu de cette question car l'absorption des agglutinines hétérologues est le premier problème qui se pose lorsque l'on tente d'individualiser les staphylocoques à l'aide de sérums absorbés spécifiques. Il s'agit alors, en effet, d'obtenir des sérums ne réagissant qu'avec un seul type de staphylocoques et privés par conséquent de leurs agglutinines hétérologues, c'est-à-dire de celles provoquant l'agglutination des souches de types différents de celui de la souche utilisée comme antigène.

Il est à remarquer que l'on ignore l'origine précise de ces agglutinines et que la question n'est pas résolue de savoir si elles sont dues à la présence sur la souche antigène d'un agglutinogène commun ou d'agglutinogènes spécifiques multiples, ou encore à la coexistence de ces deux types d'agglutinogènes. Quelle que soit cependant l'hypothèse exacte, il était naturel de penser que lors de l'absorption de ces agglutinines, la grandeur de leur absorption était fonction de la richesse de la souche absorbante en agglutinogènes correspondants.

Les résultats que nous avons obtenus dans un nombre important d'absorptions quantitatives, et dont nous ne donnerons ici qu'un exemple, montrent qu'il ne semble pas en être ainsi.

EXPÉRIMENTATION. — Il s'agit ici de l'absorption de l'antisérum préparé à partir de la souche 6 de Christie et Keogh. Ce sérum

avant absorption agglutine les souches I, II, III et 6 aux taux suivants :

Souches.	I	II	III	6
Taux	1/100	1/1 000	1/1 000	1/1 000

Trois échantillons de ce sérum dilué au 1/100 ont été absorbés respectivement par les souches I, II, III.

Pour obtenir avec chacun de ces 3 échantillons un sérum anti 6 absorbé présentant les caractères suivants :

Souches.	I	II	III	6
Taux	0	0	0	++++

il faut utiliser :

Germes I.	10 mg
Germes II.	80 mg
Germes III.	40 mg

Ces résultats montrent que, contrairement à ce que l'on pouvait attendre, le pouvoir absorbant n'est pas en rapport direct avec la richesse en agglutinogènes. En effet, les germes I qui ne sont agglutinés qu'au 1/100 absorbent beaucoup plus facilement les agglutinines hétérologues que les germes II et III qui sont agglutinés au 1/1 000 et sont par conséquent, en principe, beaucoup plus riches en agglutinogènes.

On notera aussi un certain défaut de spécificité dans l'absorption des agglutinines hétérologues, car la souche I absorbe simultanément les agglutinines responsables de l'agglutination des souches I, II, III. De même la souche III absorbe mieux les agglutinines anti II que la souche II elle-même.

On remarquera au contraire que, bien que la souche 6 n'agglutine pas à un taux plus élevé avec le sérum brut que les souches II et III, c'est elle seule qui reste agglutinable après absorption, quelle que soit la souche absorbante.

L'absorption semble donc avoir « révélé » la souche homologue. Nous ne sommes pas en mesure pour l'instant de démontrer qu'il s'agit là d'un cas général, car il nous faut auparavant multiplier les absorptions et vérifier avant tout la réalité des différents types de staphylocoques ajoutés aux 3 types initiaux de Cowan.

Toutefois, les faits précédents permettent de démontrer le caractère spécifique de l'absorption par les germes tués et desséchés car, en effet, s'il s'agissait d'une absorption non spécifique, les agglutinines homologues et hétérologues devraient alors être absorbées dans une proportion comparable.

RÉSUMÉ.

Une technique d'absorption quantitative des sérums antistaphylocoques a été mise au point et il a été en particulier vérifié

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
THE LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO

1000 UNIVERSITY AVENUE
CHICAGO, ILLINOIS 60607

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
THE LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1000 UNIVERSITY AVENUE
CHICAGO, ILLINOIS 60607

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
THE LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1000 UNIVERSITY AVENUE
CHICAGO, ILLINOIS 60607

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
THE LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1000 UNIVERSITY AVENUE
CHICAGO, ILLINOIS 60607

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
THE LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1000 UNIVERSITY AVENUE
CHICAGO, ILLINOIS 60607

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
THE LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1000 UNIVERSITY AVENUE
CHICAGO, ILLINOIS 60607

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
THE LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1000 UNIVERSITY AVENUE
CHICAGO, ILLINOIS 60607

1° OBTENTION DES MICROBES. — Les bactéries sont cultivées sur le milieu suivant :

Saccharose	30 g
Peptone Vaillant.	40 g
PO_4KH_2	6,8 g
PO_4HNa_2 , 12 H_2O	9,5 g
SO_4Mg , 7 H_2O	0,2 g
Autolysat de levure	10 g
Eau distillée.	Q. S. 1 000 ml

Après dix-huit heures de culture à 37°, les microbes sont centrifugés dans une supercentrifugeuse Sharples et immédiatement traités à l'acétone et à l'éther, puis séchés sous vide. A partir de 150 l de milieu, on obtient 50 à 55 g de corps microbiens secs. Le taux de polysaccharide des bactéries rapporté dans le tableau I a été calculé par dosage des sucres réducteurs par la méthode de Somogyi après hydrolyse acide des microbes, neutralisation et défécation.

TABLÉAU I. — Hydrolyse acide des microbes et du polysaccharide.

TEMPS d'hydrolyse en heures (SO_4H_2 , N)	SUCRE RÉDUCTEUR exprimé en glucose p. 100	
	Microbes	Polysaccharide
0,30	27,5	61,8
1		96,5
2	37,5	102,5
3	44,5	102,3
4	44,5	102,7
5	44,4	102,5

2° EXTRACTION DU POLYSACCHARIDE. — Les agents usuels d'extraction : eau bouillante, hydrate de chloral, chlorure de calcium plus ou moins concentré [20] libèrent peu de produit, sans doute du fait des liaisons intracellulaires protides-polysaccharides, comme l'a signalé Willstätter pour le glycogène. Nous avons essayé le broyage des microbes avec de la poudre de verre Pyrex [36], mais si l'extraction est ainsi plus poussée, elle est rendue plus difficile à cause du mélange verre-débris microbiens. La délipidation des microorganismes par l'éther au Soxhlet ne nous a pas semblé nécessaire, étant donné les très faibles quantités de lipides que l'on extrait. Finalement, nous avons adopté une quadruple extraction à la soude 0,75 N dans un courant d'azote, suivie d'une précipitation par l'alcool après neutralisation.

100 g de poudre (humidité 6,2 p. 100, azote 7 p. 100, sucre réducteur exprimé en glucose 44,5 p. 100) sont homogénéisés dans un mortier avec 500 ml d'eau, puis introduits dans un flacon de

3 l. On ajoute sous barbotage d'azote (lavé au pyrogallol) 500 ml de soude 2N puis 500 ml d'eau distillée. On laisse en contact une demi-heure à une heure, centrifuge, décante le liquide surnageant, amène à pH 6 avec de l'acide acétique à 50 p. 100 et on ajoute 1 volume d'alcool absolu. Le culot microbien est repris dans les mêmes conditions. On procède à quatre extractions donnant 6 l de liquide, qui, après neutralisation et précipitation par l'alcool, fournissent un culot d'extraction P_R dont le poids humide est de 456 g.

Analyse : 20 g de P_R sont lavés à l'alcool à 50 p. 100, à l'alcool absolu, puis au méthanol absolu. Ils fournissent 2,8 g de produit sec (humidité 7,9 p. 100, azote 8,68 p. 100, sucre réducteur 38,6 p. 100). Le rendement de l'extraction est de 55 p. 100. Dans le résidu microbien colorable à l'iode, il reste 29 p. 100 du polysaccharide initial.

3° PURIFICATION. — A. *Traitement par la méthode de Schorch [31]*. — 436 g du produit P_R sont repris par 1 l d'eau sous barbotage d'azote, puis on ajoute 1 l de soude 3 N et on amène à 4 l avec de l'eau distillée. On neutralise à pH 6 (électrode de verre) et chauffe à 93° après addition de 450 ml de *n*-butanol. On fait bouillir quinze minutes à cette température, puis on laisse refroidir sous agitation jusqu'à température ambiante en quatorze heures. Après ce laps de temps, on obtient un liquide opalescent se colorant fortement en violet par l'iode et une fraction butanolique contenant un abondant précipité de substances protéiques et se colorant très légèrement en violet. Jamais nous n'avons obtenu, dans cette fraction, un produit présentant les propriétés de l'amylose (coloration bleue avec l'iode), et la présence de ce corps doit être écartée.

L'ensemble, filtré, donne un résidu butanolique R et un filtrat de 3 850 ml d'une solution opalescente de laquelle le polysaccharide précipite par addition d'un égal volume d'alcool absolu. On laisse ensuite une nuit à la glacière, centrifuge, lave le précipité trois fois avec de l'alcool à 50 p. 100, puis de l'alcool absolu, du méthanol absolu et de l'éther. On sèche sous vide et on obtient à partir de 100 g de poudres microbiennes 22,2 g de produit (humidité 6 p. 100, azote 1,02 p. 100, sucre réducteur 86,4 p. 100). Rendement : 78 p. 100 du produit d'extraction.

On peut également obtenir un précipité en laissant le filtrat butanolique pendant quarante-huit heures à la chambre froide : le polysaccharide rétrograde en quasi totalité : on le recueille par centrifugation, il renferme alors moins d'azote, mais se solubilise plus difficilement. En partant de 155 g de microbes secs on obtient, après trois extractions à la soude, le même traitement au butanol que celui décrit ci-dessus et rétrogradation, 37 g de polysaccharide

(humidité 8 p. 100, azote 0,6 p. 100, phosphore 0,36 p. 100, cendre 1,2 p. 100, sucre réducteur 89,6 p. 100). C'est ce dernier produit qui a été méthylé. Le rendement de cette purification est de 87 p. 100 du produit d'extraction.

B. *Méthode de Sevag* [29]. — Pour éliminer les dernières traces d'azote, nous avons employé la méthode de Sevag. 10 g de produit obtenu selon la méthode de Schorch sont repris par 500 ml de soude N ; on centrifuge, amène à pH 5 avec de l'acide acétique et on agite avec 200 ml de chloroforme et 20 ml d'alcool isoamylique. Après trente minutes, on centrifuge et siphonne la portion aqueuse. On répète l'opération jusqu'à ce que la fraction protéique qui se forme à l'interface eau-chloroforme ait disparu. On dialyse pendant quarante-huit heures contre eau distillée, puis on centrifuge le produit qui a rétrogradé. On le lave à l'alcool à 50 p. 100, à l'alcool absolu, au méthanol absolu et à l'éther, on sèche sous vide à la température ordinaire. Le produit (4,1 g) contient : humidité 10,3 p. 100, azote 0,07 p. 100, phosphore 0,02 p. 100, cendres 0,16 p. 100, sucre réducteur 95 p. 100. Le rendement de l'opération est de 39 p. 100. Les pertes sont très élevées du fait du peu de solubilité du polysaccharide en milieu acide.

C. *Méthode à l'acide stéarique*. — Nous avons pu éliminer presque complètement l'azote avec de moindres pertes en traitant le produit brut par l'acide stéarique. On sait [32, 37] que cet acide possède la propriété de s'associer à l'amylose pour donner un produit insoluble. Mode opératoire [19] : 4 g de produit sont dissous dans 500 ml de soude N. On amène à pH 5 avec de l'acide acétique et on complète à 800 ml avec de l'eau distillée. En agitant fortement on ajoute 4 g d'acide stéarique dissous dans 10 ml de méthanol absolu. On agite pendant quinze minutes, centrifuge et filtre le surnageant. Le filtrat peut être précipité soit directement par l'alcool, soit par rétrogradation lors de la dialyse. Le produit ne renferme que 0,1 p. 100 d'azote ; on le traite au Kumagawa par l'éther pendant six heures pour éliminer les dernières traces d'acide stéarique et on sèche. Le rendement est de 80 p. 100.

4° ETUDE DU POLYSACCHARIDE. — A. *Propriétés physiques*. —

a) *Solubilité* : Le produit purifié se présente sous forme d'une poudre blanche qui, séchée, est insoluble dans l'eau froide : fraîchement précipité et humide, il se solubilise très faiblement dans l'eau chaude. Il est soluble dans la soude, l'hydrate de chloral, la formamide, l'éthylène-diamine. En solution dans la soude, il rétrograde après neutralisation et d'autant plus vite que le produit est plus vieux et la solution plus concentrée. Il donne des solutions blanchâtres et opalescentes rendant difficiles les mesures polarimétriques.

b) *Pouvoir rotatoire* : $[\alpha]_D^{20} = + 158^\circ$ dans la soude 0,5 N ($c = 0,25$ p. 100, $l = 2$ dm).

c) *Viscosité* : Dans l'éthylène-diamine à 20° : $\eta_{sp}/c = 0,19$
 $c = 0$

d) *Poids moléculaire* : Nous n'avons pas pu appliquer la méthode fondée sur la réduction de l'acide dinitrosalicylique en milieu alcalin par le groupe aldéhydique libre [21] du fait de la faible réduction et de la forte opalescence des solutions. En opérant sur des quantités de polysaccharide de 300 à 600 mg on voit apparaître la coloration orange due à une réduction, mais les lectures sont faites à la limite de sensibilité de la méthode. Le degré de polymérisation est supérieur à 1 100 et le poids moléculaire chimique supérieur à 180 000.

B. *Etude chimique*. — a) *Réactions colorées* : Molish : positive. Seliwanoff : négative ; pas de fructose. Bial : négative ; pas de pentose.

b) *Constituant du polysaccharide* : Après hydrolyse acide (l'évolution en est donnée sur le tableau I), le seul constituant décelable par chromatographie sur papier à deux dimensions (butanol-eau et collidine-eau) est le glucose révélé au phtalate acide d'aniline. La révélation à l'urée est négative, ce qui indique l'absence de fructose. La phénylosazone du polysaccharide hydrolysé a un P. F. = 205° (non corrigé) : pas de dépression avec la glucosazone. La solution hydrolysée a un pouvoir rotatoire dextrogyre qui correspond à la présence du *d*-glucose.

c) « *Blue value* » : Le polysaccharide donne avec l'iode une coloration rouge violacé et fixe l'iode comme l'amylose. La « *Blue value* » a été déterminée par la méthode de Mc Cready et Hassid [7]. 50 mg de polysaccharide sont dissous dans 2 ml de soude 2,5 N et amenés à 50 ml. 2 ml de cette solution, additionnés de 11 gouttes d'HCl 6N, sont versés dans une fiole jaugée de 100 ml après addition d'un mélange d'iode et de IK. On opère de même sur 50 mg d'amylopectine de pomme de terre. Les lectures sont faites au photocolorimètre Klett Summerson, filtre K 66. On trouve :

Amylopectine	47
Polysaccharide	28

d) *Action de la β -amylase* : L'insolubilité du polysaccharide et sa forte rétrogradation en milieu acide nous ont obligés à opérer selon la technique de Bernfeld et Görtler [4].

70 mg de polysaccharide sont dissous dans 1 ml de soude N ; on dilue, centrifuge, transvase dans une fiole jaugée de 50 ml et complète au volume. On fait tomber goutte à goutte et en agitant 25 ml de cette solution (une goutte par seconde) dans 25 ml d'un

milieu contenant : 2 ml d'une solution de β -amylase à 600 unités de β -amylase de patate douce cristallisée (Balls [4]) ou à 600 unités de β -amylase de blé [22], 4 ml de tampon acétate à pH 4,8 et 19 ml d'eau. La température est maintenue à 37°. A la fin de l'addition du polysaccharide, le maltose est dosé par l'acide dinitrosalicylique [33] et on continue les dosages pendant plusieurs heures (voir fig. 1). Le pourcentage de dégradation varie de 85 à 90 p. 100.

e) *Dextrine résiduelle* : Dans une solution agitée contenant 22 ml de β -amylase de blé (3 000 U), 80 ml de tampon acétate à pH 4,8, on fait tomber goutte à goutte 200 ml d'une solution alcaline de 1 360 mg de polysaccharide. L'enzyme agit pendant cinq heures, on neutralise puis dialyse à 0° pendant vingt-quatre

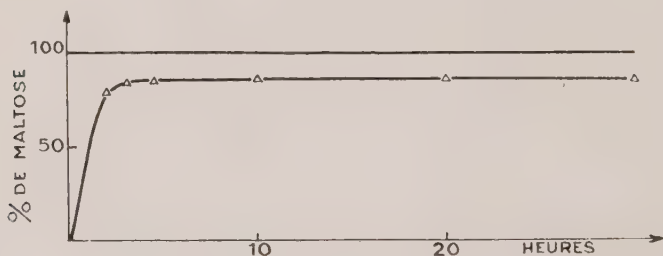


FIG. 1. — Dégradation par la β -amylase cristallisée.

heures pour éliminer le maltose. On concentre sous vide à 35° jusqu'à 30 ml, on centrifuge la solution et on l'additionne de 2 volumes d'acétone à -20°. La dextrine précipite, on lave à l'acétone à l'éther et on sèche. On obtient 350 mg d'une poudre blanchâtre donnant en solution une coloration rouge brique avec l'iode N/100. 70 mg de cette dextrine sont repris par 6 ml d'eau, on porte au bain-marie bouillant pendant cinq minutes et on centrifuge. 5 ml de cette solution sont additionnés de 1 ml de tampon acétate à pH 4,8 et de 150 unités de β -amylase cristallisée (Balls). Le volume est amené à 10 ml, on laisse à 37° et on dose le maltose formé.

On a :

Sucre total par millilitre de solution après hydrolyse chlorhydrique.	2,25 mg
Sucre libre au temps zéro.	0,31 mg
Maltose libéré par la β -amylase après 4 heures.	0,40 mg
Maltose libéré par la β -amylase après 48 heures.	0,45 mg

Après quarante-huit heures on prélève 5 ml de la solution, on neutralise à pH 6,8, on ajoute du ClNa et 50 U d' α -amylase de

salive cristallisée. On laisse agir encore quarante-huit heures, on trouve alors par ml (chiffres ramenés à la concentration initiale) :

α -amylase	0,55 mg/ml
β -amylase	0,44 mg/ml

On voit que l' α -amylase n'a que faiblement attaqué la dextrine résiduelle, puisque le sucre libéré est passé de 0,45 mg à 0,55 mg par millilitre sur un total de 2,25 mg. La figure 2 résume l'expérience.

La présence d'une dextrine résiduelle prouve l'existence d'un polysaccharide ramifié. Le degré de ramification en est déterminé au paragraphe g.

f) *Mesures potentiométriques* : Nous avons employé la méthode

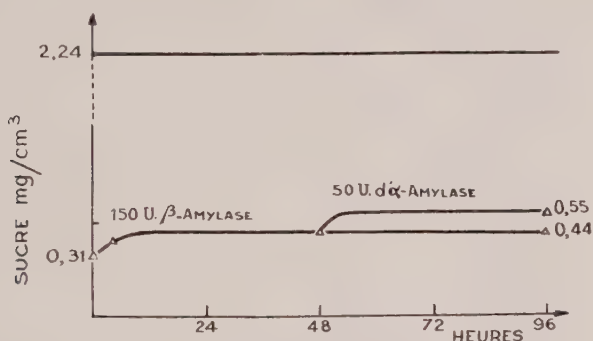


FIG. 2. — Attaque de la dextrine résiduelle par l' α -amylase.

de Bates et coll. [3] modifiée par Wilson et coll. [37], sur un polysaccharide purifié selon Sevag (P_1), purifié au stéarate (P_2) et sur ce dernier traité à l'iode (P_3).

Nous avons d'abord dosé la quantité d'iode pouvant oxyder les substances réductrices. 100 mg de P_1 et 100 mg de P_2 sont dissous séparément dans 1 ml de soude 2,5 N. On neutralise avec 4,91 ml d'HCl N et on ajoute 830,3 mg d'IK et 5 ml d'iode N/50. Après une heure à l'obscurité, on titre l'iode consommé par du thio-sulfate N/50.

	IODE N/50 (ml)
Blanc	0,42
P_1	0,28
P_2	0,28
Différence	0,14

La différence correspond à 2,8 ml d'iode N/1 000 pour 100 mg de produit. Les prises d'essai pour les mesures potentiométriques

variant de 5 à 35 mg et l'iode fixé allant jusqu'à 20 ml d'iode N/1 000, on voit que l'iode disparu par oxydation représente seulement 2 à 3 p. 100 de la quantité d'iode formant un complexe avec le polysaccharide. Nous avons d'ailleurs traité le polysaccha-

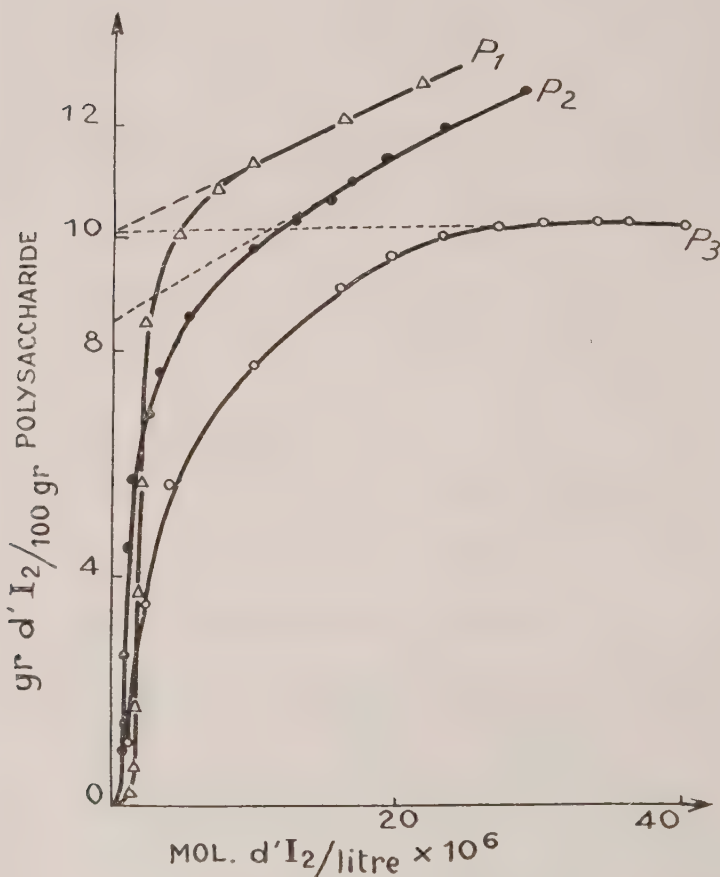


FIG. 3. — Mesures potentiométriques.

ride P₂ par l'iode avant la mesure potentiométrique. 200 mg de P₂ sont dissous dans 2,3 ml de potasse 2,5 N, on dilue à 100 ml après neutralisation par 4,91 ml d'HCl N et addition de 20 ml d'iode N/50. On laisse une heure en contact à l'obscurité à température ambiante. Enfin, on centrifuge et détruit l'iode dans le complexe par le thiosulfate. On solubilise le polysaccharide par la soude et on dialyse quarante-huit heures contre eau distillée,

jusqu'à élimination de tout l'iode, ce qui donne le produit P_3 . La figure 3 rapporte les courbes de mesures potentiométriques pour P_1 , P_2 et P_3 . Il y a formation d'un complexe et le polysaccharide fixe de 8 à 10 p. 100 d'iode, soit environ deux fois moins que l'amylose.

g) *Détermination des groupes terminaux* : 1° *Méthode au périodate* : On dose l'acide formique libéré [8, 28]. Nous avons opéré, selon K. H. Meyer et Rathgeb [23] en employant du périodate de sodium 0,25 N à pH 5,8 à 4°. L'acide formique est titré en retour par HCl N/100. Le polysaccharide est dissous dans 2 ml de soude 2 N, on dilue jusqu'à 25 ml et on dialyse pendant quarante-huit heures contre eau distillée. On opère sur la suspension. La figure 4 exprime les résultats de l'expérience. Le p. 100 de groupes terminaux est de $6 \pm 1,5$.

2° *Méthylation* (2) : On opère selon K. H. Meyer et coll. [24].

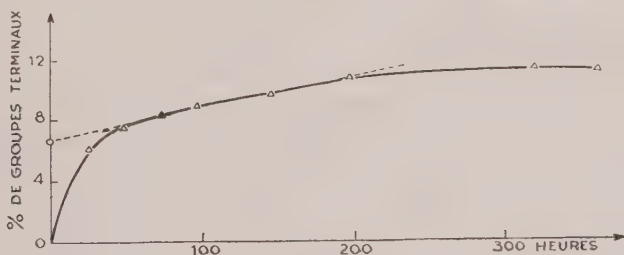


FIG. 4. — Oxydation du polysaccharide par NaIO_4 .

12 g de polysaccharide sont dissous par petites fractions dans de la soude N. On centrifuge pour éliminer un faible résidu insoluble et on amène avec de l'eau distillée à 400 ml que l'on place dans un ballon à 3 cols de 1 l. On ajoute 250 ml de sulfate de méthyle et 400 ml de soude à 30 p. 100 à la température de 55° dans un courant d'hydrogène. Le sulfate de méthyle est introduit par portions de 15 à 20 ml toutes les dix minutes en agitant violemment. L'alizarine R sert d'indicateur et à chaque virage on alcalinise par de la soude à 30 p. 100. A la fin, on relargue au sulfate d'ammoniaque, on centrifuge le produit précipité et on méthyle à nouveau dans les mêmes conditions. La troisième méthylation est effectuée en dissolvant le polysaccharide dans l'acétone. On ajoute alors par portions 200 ml de sulfate de méthyle et 350 ml de soude à 30 p. 100. Pour la huitième méthylation, on utilise 150 ml de sulfate de méthyle et

(2) Nous remercions le Dr Claude Giddey pour l'aide qu'il nous a apportée lors de la méthylation.

240 ml de soude. Après neuf méthylations le produit renferme 39,8 p. 100 de méthoxyl. Après quinze méthylations le produit est repris par l'acétone, filtré et concentré sous vide jusqu'à ce qu'il dépose. On le reprend par le chloroforme, le sèche sur sulfate de magnésium anhydre, on filtre et précipite par l'éther de pétrole. On obtient 6 g d'une masse vitreuse, blanc jaunâtre après dessiccation sous haut vide. On purifie par dissolution dans le chloroforme et reprecipitation à l'éther de pétrole. On sèche sous vide sur pentoxyde de phosphore. Le produit blanc est soluble dans l'acétone et le chloroforme. Il gonfle dans l'éther et l'alcool et il est insoluble dans l'éther de pétrole. Il se colore en violet bleuté par l'iode.

$[\alpha]_D^{20}$ dans CHCl_3 $+ 216^\circ$ ($c = 0,5$ p. 100, $l = 2$ dm)

Viscosité dans CHCl_3 $\eta_{sp}/c = 0,46$
 $c = 0$

Méthoxyl produit brut 42,79 p. 100

Méthoxyl produit pur 43,48 p. 100

Nous avons vérifié par dosage à l'iode (Willstätter et Schüdel [38]) que le produit méthylé n'avait pas été oxydé, ce qui fausserait les dosages des sucres méthylés. Nous avons employé la méthode de Jones [42] pour doser le pourcentage des sucres méthylés avec les variantes suivantes : suppression de la neutralisation au carbonate d'argent et du passage sur amberlite. 100 mg de produit méthylé sont dissous dans du méthanol chlorhydrique à 4 p. 100 et introduits dans une ampoule scellée. On chauffe sept heures au bain-marie bouillant. Après évaporation partielle du méthanol, les méthylglucosides sont additionnés de 5 ml d'acide chlorhydrique N et chauffés en tube scellé pendant douze heures au bain-marie. On évapore sous vide sur de la potasse et on reprend plusieurs fois le résidu par l'eau pour chasser les dernières traces d'acide chlorhydrique. On dissout finalement dans 0,1 ml d'eau et on sépare les sucres par chromatographie sur

TABLEAU II.

	POURCENTAGE				MOYENNE p. 100	Rg = $\frac{r_f}{r}$ rapporté au tétraméthyl- glucose (moyenne)
Tétraméthylglucose . .	4,9	6	3,9	4,9	5 ± 1	
Triméthylglucose . . .	71	74	70	71	71	0,84
Diméthylglucose . . .	23	19	25	23	23	0,55
Monométhylglucose . .	1	1	1	1	1	0,27

papier en utilisant du *n*-butanol additionné de 15 p. 100 d'eau comme solvant. Entre deux bandes de références révélées au phthalate acide d'aniline, on découpe la bande contenant les tétraméthyl, triméthyl, diméthyl et monométhylglucoses. On élue par capillarité à l'eau froide et on oxyde à l'iode N/50. Le tableau II rapporte les résultats de 4 chromatogrammes.

Par cette méthode on obtient 5 ± 1 p. 100 de groupes terminaux.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

Le polysaccharide se présente comme une grosse molécule de degré de polymérisation supérieur à 1 100 et dont les propriétés tiennent à la fois des polysaccharides du type linéaire (amylose) et ramifié (amylopectine et glycogène).

Comme l'amylose, le polysaccharide rétrograde en solution alcaline après neutralisation. Il est fortement attaqué (jusqu'à 90 p. 100) par la β -amylase, il forme un complexe avec l'iode et donne une coloration presque semblable à celle de l'amylopectine ; il est ramifié, comme le montrent l'attaque au périodate et la méthylation. Il donne, d'autre part, une dextrine résiduelle très peu attaquée par l' α -amylase cristallisée. Cette faible attaque s'explique parfaitement bien : si on suppose un poids moléculaire minimum de 180 000 correspondant à 1 100 restes de glucose et un degré de ramification de 5 p. 100, l'attaque β -amylasique laisse une dextrine de 120 restes de glucose ; si on soustrait les 55 restes provenant des ramifications, il reste 65 glucoses, c'est-à-dire qu'entre chaque point de branchement il doit exister 1 à 2 glucoses, ce qui rend compte de la faible attaque α -amylasique. En effet, un plus grand nombre de restes de glucose sont nécessaires entre chaque branchement pour permettre l'action de l' α -amylase.

Ce polysaccharide n'est pas un mélange. La présence d'amylose est exclue, car jamais nous n'avons obtenu la coloration bleue à l'iode (sensibilité 1 p. 100) que donnerait un mélange de glycogène ou d'amylopectine et d'amylose. De plus, le traitement au stéarate aurait éliminé celle-ci.

L'hypothèse la plus plausible pour la structure est celle d'un polysaccharide fortement ramifié portant de longues chaînes extérieures. Le tableau III résume les propriétés du polysaccharide et les compare à celles de l'amylose, de l'amylopectine et du glycogène rapportées par divers auteurs [24, 20, 23, 4, 6].

Il ressort de cette étude et du tableau ci-dessus que le polysaccharide de *Clostridium butyricum* est d'un type, non encore signalé jusqu'à présent, intermédiaire entre l'amylose et l'amylopectine.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

Séance du 7 Février 1952.

Présidence de M. GASTINEL

COMMUNICATIONS

LES FACTEURS NÉFASTES A LA CULTURE DU BACILLE DE KOCH A PARTIR DE PRODUITS PATHOLOGIQUES

par F. TISON.

(Sanatoriums de Praz-Coutant.)

La culture du bacille de Koch n'égale pas encore en sensibilité l'inoculation au cobaye (Hauduroy [1], Tison [2], Slavka Mrchevitch [3]).

Si la culture a fait des progrès [4], l'inoculation en a fait de parallèles [5]. Le fait que pour certains produits non surinfectés la sensibilité soit du même ordre [2], nous donne cependant tout apaisement quant à la qualité des milieux utilisés (Jensen, Dubos).

C'est donc l'élimination des germes banaux indésirables qui grève les résultats des cultures. Nous avons déjà étudié ici même les procédés utilisés dans ce but [4].

Mais en dehors de l'action toxique des produits chimiques eux-mêmes sur le bacille de Koch, il faut tenir compte d'autres facteurs.

Nous ne reviendrons pas sur l'action protéolytique des anaérobies ni sur l'action du suc gastrique en ce qui concerne les crachats recueillis dans l'estomac [6], (Vincent et Birge [7]).

Nous nous proposons d'étudier les substances qui persistent après le traitement chimique, ou qui sont créées par lui, et que l'on ajoute forcément au milieu de culture en l'ensemencant.

La technique utilisée pour éliminer les germes associés est celle qui résulte des études précédentes [4] :

Addition à 2 cm³ de crachats de 6 cm³ de soude à 4 p. 100, mélanger.

Transvasement en tube à centrifuger stérile, agitation une demi-heure à 37°.

Addition de 50 cm³ d'acide sulfurique stérile à 4,5 p. 1 000. Centrifugation.

Ensemencement du culot sur 6 tubes de Jensen après émulsion dans 3 cm³ de solution tampon (phosphate monopotassique, 1 ; phosphate bipotassique, 2 ; glycérine, 5 ; eau, 500).

Pour nous mettre dans les conditions habituelles de diagnostic, nous partions de crachats recueillis directement ou par tubage gastrique et réputés *négatifs à l'examen optique*.

1° *Quantité de produit ensemencé*. — Une fois le culot obtenu et dilué dans 3 cm³ de solution tampon, il était ensemencé sur 6 tubes en dose progressive, soit : I, II, III, IV, V, VI gouttes par tube.

Les résultats pour les 35 crachats ensemencés sur 210 tubes sont rapportés sur la figure 1.

Dans de nombreux cas les meilleurs résultats ont été obtenus dans les tubes II à IV.

Conclusions : a) Si l'on veut ensemencer plus de produit, il convient

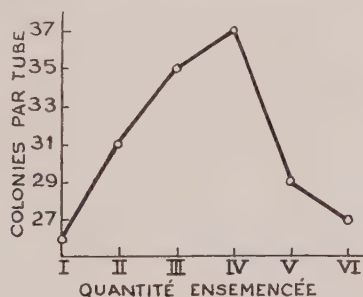


FIG. 1. — Culture par ensemencement de quantités progressives (35 cas).

d'ensemencer beaucoup de tubes et de ne pas mettre plus de II à IV gouttes par tube.

b) Le fait que le dernier tube pousse souvent moins bien nous confirme la présence de substances néfastes « en contexte ». (Il a naturellement été vérifié que la solution tampon n'était pas nuisible en elle-même.)

Etude des substances empêchantes. — Ces substances sont-elles présentes avant traitement par la soude ou résultent-elles du traitement clinique ?

a) Nous avons procédé à des repiquages, en partant d'une émulsion homogène aqueuse de bacilles humains, sur 6 tubes de Jensen.

Du liquide pleural stérile, plus ou moins purulent, a été ajouté en quantité croissante du deuxième au sixième tube.

Plus le liquide est purulent et plus l'action empêchante se manifeste.

La même expérience a été faite avec des pus de crachats traités par la soude.

Les résultats sont superposables avec la différence qu'une neutralisation imparfaite est très nuisible.

Cette neutralisation est plus difficile pour les crachats épais, la pénétration de l'acide se faisant mal. Les crachats recueillis par tubage se neutralisent aisément.

Conclusion : Les pus contiennent des substances empêchantes. Ceci ne nous apprend rien après les travaux de Buc et de Courmont. Le pH de l'inoculation a une grande importance.

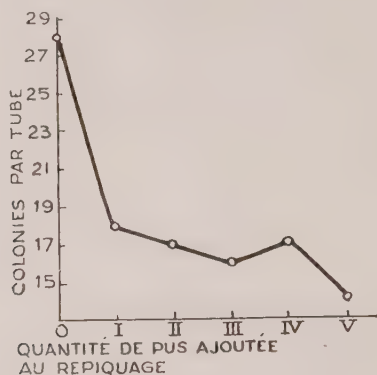


FIG. 2. — Repiquage en présence de quantité croissante de pus stérile (40 cas).

Nous avons recherché les moyens qui permettraient d'éviter ces inconvénients.

A. *Pour les pus épais non surinfectés.* — Pus pleuraux, abcès froids... Nous avonsensemencé 19 pus.

Sur 3 tubes, III gouttes de pus non modifié ;

Sur les 3 autres tubes, III gouttes du même pus dilué au 1/10 dans du sérum physiologique stérile.

Culture du pus pur ou dilué (114 tubes).

PUS PUR	PUS DILUÉ AU 1/10
Moyenne de colonies par tube : 21.	Moyenne de colonies par tube : 25.

Malgré un inoculat dix fois moindre, les cultures ont été plus fréquentes et les colonies plus nombreuses dans les 3 derniers tubes. Les tubesensemencés avec le pus pur sont en grande partie altérés et protéolysés par des ferments.

B. *Pour les crachats.* — Ils sont toujours surinfectés. Nous avons remarqué que les crachats recueillis par tubage gastrique donnaient de petits culots de centrifugation bien secs et bien neutres. Les inconvénients sont alors réduits au minimum. La digestion préalable favorise la pénétration des substances chimiques et la neutralisation.

Nous savons, hélas ! qu'elle n'est pas sans action sur le bacille de Koch.

Après avoir vérifié, par contre, que la papaïne était sans action sur le bacille tuberculeux, nous avons, comme Sédallian [8], essayé de digérer artificiellement les crachats. Ambert avait utilisé la pepsine [9].

La papaïne : 0,10 g environ de papaïne étaient ajoutés à 2 cm³ de crachats dilués dans un peu de sérum physiologique. Après vingt-quatre heures de contact, la digestion était amorcée, mais la flore banale s'était développée. La présence de pénicilline [5] écarte cet inconvénient. Le procédé usuel de culture donne alors des résultats satisfaisants. Vingt cultures ont été faites sur 120 tubes.

Culture après traitement à la papaïne (20 cas).

TÉMOINS 11 positifs	PAPAÏNE 13 positifs
650 colonies.	830 colonies.

Les résultats sont favorables, mais la méthode apporte une complication et un retard de vingt-quatre heures.

Nous avons obtenu des résultats satisfaisants en procédant autrement par lavage du culot.

Le lavage. — Dans le crachat à étudier, il convient de ne prélever que les parcelles purulentes (2 cm³ au maximum pour 6 tubes). Une fois le culot de centrifugation obtenu par la technique exposée, le tube à centrifuger est rempli d'eau distillée stérile et centrifugé à nouveau.

Il en résulte une forte dilution des produits chimiques pouvant subsister (sulfate de soude) et une réduction du culot. Nous avonsensemencé 3 tubes avant lavage et 3 tubes après.

Culots de centrifugation lavés. 27 cultures. 162 tubes.

TÉMOINS Positifs 17	LAVÉS Positifs 18
Colonies en moyenne : 98.	Colonies en moyenne : 137.
Tubes positifs : 45.	Tubes positifs : 51.

Cette technique simple donne des résultats excellents dans le cas de crachats recueillis directement.

CONCLUSIONS. — Si l'on veut augmenter la quantité de produit ensemencé, il faut multiplier les tubes et non pas ensemencer richement.

Il convient de diluer les pus non surinfectés.

Il est préférable de laver les culots de centrifugation avant de les ensemencer.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. HAUDUROY. *Soc. Biol. clin.*, 1949.
- [2] F. TISON. *Sem. hôp. Paris*, 1949, **9**, 389-392.
- [3] SLAVSKA MRCEVITCH. *Rev. Immunol.*, 1949, **43**, 183-190.
- [4] F. TISON. *Ces Annales*, 1951, **80**, 659-663.
- [5] F. TISON. *Ces Annales*, 1950, **79**, 225-228.
- [6] F. TISON. *Ces Annales*, 1947, **73**, 684-687.
- [7] V. VINCENT et E. BIRGE. *Am. Rev. Tub.*, 1947, **55**, 556-571.
- [8] P. SEDALLIAN et R. CARRAZ. *Ces Annales*, 1947, **73**, 398-399.
- [9] P. AMBERT. *Ann. Biol. clin.*, 1951, **7**, **8**, **9**, 405-410.

RECHERCHES SUR LES AGGLUTININES HÉTÉROLOGUES DES SÉRUMS ANTISTAPHYLOCOCCQUES

II. — ÉTUDE DE L'AGGLUTINATION PAR LES SÉRUMS BRUTS

par J. PILLET et B. ORTA.

(*Institut Pasteur. Annexe de Garches.*)

Nous étudierons dans ce travail les résultats de l'étude des taux d'agglutinations des souches I, II, III de Cowan et des souches 4, 5, 6, 7, 8, 9 de Christie et Keogh, par les sérums bruts de 51 lapins diversement préparés.

Ving-neuf de ces sérums proviennent de lapins vaccinés à l'aide de ces différentes souches et de 3 souches isolées sur l'animal et possédant des caractères biologiques particuliers [1] ; 22 autres ont été prélevés sur des lapins considérés comme neufs.

L'intérêt de ces résultats réside dans le fait que nous avons pu mettre en évidence un certain ordre dans les réactions d'agglutinations hétérologues et que l'on retrouve sensiblement cet ordre, à la dilution près, quel que soit le sérum testé.

C'est la mise en évidence de ce fait, et l'étude des conséquences théoriques et pratiques que l'on peut en déduire, qui feront l'objet de cette note.

L'étude de l'agglutination par les sérums bruts constitue par ailleurs la première partie des recherches concernant les souches 4, 5, 6, 7, 8, 9 de Christie et Keogh, dont il y a lieu de vérifier l'individualité sérologique.

MATÉRIEL. — Souches. — Toutes les souches utilisées sont des souches de staphylocoques pathogènes. Ce sont les souches I, II, III de Cowan et 4, 5, 6, 7, 8, 9 de Christie et Keogh. Elles proviennent de la « National Collection of type cultures » de Londres, d'où elles nous ont été envoyées sous les numéros respectifs suivants :

6127, 6128, 6130, 6131, 6133, 6134, 6135, 6136, 6137 (1).

(1) Nous remercions bien sincèrement M. Cowan d'avoir eu l'obligeance de nous adresser ces souches.

Nous avons préparé, par ailleurs, 6 sérums à l'aide des souches 280, 754 et 749 de notre collection. Ces souches isolées sur l'animal présentent les caractères biologiques suivants : elles sont « Coagulase » positives, « Fibrinolysine » négatives et α - β -toxigènes.

Milieux. — Les souches utilisées dans les tests proviennent de cultures de dix-huit heures sur un milieu composé de 8 parties de milieu A et de 2 parties de milieu C. La composition de ces deux milieux a été décrite antérieurement [2]. L'emploi de ce milieu mixte permet d'éviter au maximum les agglutinations spontanées sans modifier pratiquement les agglutinations spécifiques.

TECHNIQUES. — Les techniques de préparation des sérums et d'agglutination sur lame ont été décrites et précisées précédemment [3, 4].

RÉSULTATS. — Nous indiquerons tout d'abord les résultats obtenus dans l'étude des taux d'agglutinations des 9 souches par les sérums de lapins vaccinés. Nous respecterons ainsi la chronologie de nos expériences, car c'est la constatation d'une variation ordonnée dans ces résultats qui nous a incités à faire une étude systématique des

TABLEAU I.

ANTI-SÉRUM	$\frac{1}{D}$	SOUCHES TESTÉES								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2 000	+++	++	++	++++	0	0	0	+++	0
1	2 000	++++	++	++	++++	0	0	0	+++	0
1	2 000	++++	++++	++++	++++	0	0	0	++++	0
2	750	+++	++++	++++	++++	++++	0	0	+++	0
2	500	+++	+++	+++	+++	++	0	0	++	0
2	250	++++	+++	++	++++	++	0	0	++	0
3	1 000	0	++	+++	++++	0	0	0	++++	0
3	2 000	0	+	++++	++++	0	0	0	++++	0
3	1 000	0	++	+++	++++	0	0	0	+++	0
4	1 000	0	+	+++	++++	0	0	0	++++	0
4	1 000	0	+	+++	++++	0	0	0	++++	0
5	1 000	0	+++	++	++++	++++	0	0	+++	0
5	1 500	0	++++	++++	++++	+++	0	0	++++	0
6	1 000	0	++	+++	+++	0	0	0	++	0
6	500	0	+++	++++	++++	0	++	0	+++	0
7	750	0	++	++	+++	0	0	+++	++++	0
7	500	0	+	+++	+++	0	0	++++	++++	0
7	750	0	+++	++++	++++	0	0	+++	++++	0
8	1 000	++	+++	+++	++++	0	0	0	++++	0
8	500	++++	+++	++++	++++	0	0	0	++++	0
8	1 000	+++	+++	+++	++++	0	0	0	++++	++
9	1 500	0	+	++++	++++	0	0	0	++++	+++
9	500	+	++	+++	++++	0	0	0	++++	++++
754	1 500	0	+++	++++	++++	0	0	0	++++	0
754	500	0	+	+++	++++	0	0	0	+++	0
749	750	0	++	++++	++++	0	0	0	++++	0
749	750	0	+	++++	++++	0	0	0	++++	0
280	1 500	0	++	+++	++++	0	0	0	+++	0
280	500	0	+	+++	+++	0	0	0	++	0

sérums de lapins considérés comme neufs. Jusque-là, en effet, nous nous contentions de rechercher les agglutinines naturelles à l'aide des souches I, II et III et avons seulement remarqué que la souche III était celle avec laquelle on enregistrait les taux les plus élevés.

Les résultats obtenus avec les sérums de lapins vaccinés peuvent être résumés de la façon suivante :

Dans ce tableau où D représente la dilution de sérum, le nombre de croix est proportionnel à l'intensité de l'agglutination. La dilution choisie pour chaque sérum est celle mettant le mieux en évidence les variations du taux d'agglutination selon la souche testée.

Avant d'étudier ces résultats, nous donnerons immédiatement, et à titre comparatif, ceux obtenus avec les sérums de lapins considérés comme neufs. Ces résultats étant sensiblement identiques avec les 22 sérums examinés, nous n'en donnerons que 10 exemples.

En ce qui concerne les agglutinations hétérologues qui seules nous intéressent ici, l'examen comparatif des tableaux permet les constatations suivantes :

TABLEAU II.

$\frac{1}{D}$	SOUCHES TESTÉES								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
100	0	0	+++	+++	0	0	0	+++	0
100	0	0	+++	+++	0	0	0	+++	0
100	0	0	++	++	0	0	0	+	0
100	0	0	+++	+++	0	0	0	+++	0
100	0	0	+++	+++	0	0	0	++	0
100	0	0	++++	++++	0	0	0	+++	0
100	0	0	++	++	0	0	0	++	0
100	0	0	+++	+++	0	0	0	+++	0
100	0	0	++	++	0	0	0	+	0
100	0	0	+++	+++	0	0	0	+++	0

Quel que soit le sérum testé, certaines souches, toujours les mêmes, restent seules agglutinées aux dilutions choisies ; ce sont les souches III, 4, 8 et à un moindre degré la souche II (tableau I).

Les sérums de lapins neufs ou vaccinés ne se différencient pas qualitativement de ce point de vue. Seule la dilution des sérums varie d'un tableau à l'autre. Elle est de 1/100 pour les sérums de lapins neufs et va du 1/250 au 1/2 000 pour les sérums d'animaux vaccinés.

Les souches I, 5, 6, 7, 9 ne sont pas agglutinées aux dilutions utilisées, sauf dans quelques cas exceptionnels qui mériteront, pour cette raison, de retenir l'attention (souche I avec les sérums 8 ; souche 5 avec les sérums II).

Dans l'état actuel des recherches, l'interprétation de ces faits et les deductions que l'on peut en tirer semblent pouvoir être résumées ainsi.

1° Si l'on ne considère pour l'instant que les sérums de lapins vaccinés, il existe dans ces sérums, quelle que soit la souche immu-

nisante, une ou plusieurs agglutinines communes réagissant avec les souches III, 4, 8 et, à un moindre degré, avec la souche II. Ceci implique l'existence à la surface de chacun des staphylocoques utilisés comme antigène d'un ou plusieurs agglutinogènes communs.

Nous pensons qu'il s'agit vraisemblablement d'un agglutinogène commun unique, car les taux d'agglutinations des souches II, III, 4, 8 sont sensiblement dans un rapport constant. Toutefois, ce point devra être à nouveau précisé et le sera en particulier lors des études d'absorption de ces sérums.

Un fait intéressant est que cet agglutinogène commun doit exister aussi à la surface des souches isolées sur l'animal, bien que ces souches possèdent des caractères biologiques différents de celles isolées sur l'homme.

2° Lorsque l'on n'envisage que les réactions d'agglutinations hétérologues, l'examen comparatif des deux tableaux montre que la vaccination par une souche pathogène quelconque ne fait qu'augmenter quantitativement le taux des agglutinines naturelles. Il semble donc logique de penser que ces agglutinines naturelles, qui présentent les mêmes caractères qualitatifs que les agglutinines acquises, sont dues à une première agression staphylococcique. S'il n'en était pas ainsi, il serait difficile d'expliquer la similitude des résultats constatés avec les deux types de sérums.

3° L'étude de l'agglutination d'une souche par un ou plusieurs sérums bruts devrait permettre, par ailleurs, une fois son type spécifique défini, de déterminer sa richesse en agglutinogène commun. C'est ainsi que, d'après les résultats des tableaux précédents, il est très probable que les souches III, 4, 8 sont plus riches en agglutinogène commun que les souches I, II, 5, 6, 7, 9. Nous avons pu, par l'étude des taux d'agglutinations aux dilutions inférieures à celles rapportées ici, préciser ce point et ordonner approximativement les souches utilisées dans ce travail suivant leur richesse en agglutinogène commun. Les résultats obtenus peuvent s'exprimer ainsi :

$$4, 8, 3 > 2 > 5, 1 > 9 > 7, 6$$

4° On observe à l'examen du tableau I certaines réactions anormales. C'est ainsi qu'aux dilutions choisies :

- a) Les sérums II agglutinent les souches I et 5 ;
- b) Les sérums 5 agglutinent fortement la souche II ;
- c) Les sérums 8 agglutinent la souche I.

Le fait que ces cas soient exceptionnels et ne puissent être mis sur le compte d'erreurs d'expériences nous incite à penser que ces anomalies sont significatives.

Nous nous en tiendrons pour l'instant à cette conclusion, car seule l'absorption sélective des sérums II, 5 et 8 actuellement en cours nous permettra de définir les rapports existant entre ces sérums et les souches qu'ils agglutinent et de choisir entre les différentes hypothèses qui expliquent ces résultats anormaux.

5° D'autre part, ces recherches permettront peut-être d'aborder d'un point de vue nouveau le problème complexe de la thérapeutique des staphylococcies par la méthode de vaccination antimicrobienne.

Il ressort, en effet, du premier tableau que, si un malade est infecté par une souche 7 par exemple, il sera nécessaire que cette souche soit contenue dans le vaccin si l'on veut obtenir un taux élevé d'agglutinines anti-7 dans le sérum du malade. Au contraire, un sujet infecté par une souche 4 verra son taux d'agglutinines anti-4 augmenter notablement, quelle que soit la souche de staphylocoques pathogènes contenue dans le vaccin.

RÉSUMÉ. — Les résultats de l'étude des agglutinations hétérologues des sérums de lapins neufs, ou vaccinés à l'aide de souches pathogènes bien définies, sont en faveur des conclusions suivantes :

Les staphylocoques pathogènes, isolés sur l'homme ou sur l'animal, possèdent à leur surface en quantité variable un ou plusieurs agglutinogènes communs. Il s'agit, à notre avis, plus vraisemblablement d'un agglutinogène commun unique.

L'agglutination par les sérums bruts permet d'évaluer avec une certaine précision la richesse des différentes souches en agglutinogène commun.

Les agglutinines naturelles des sérums de lapin seraient dues à une contamination staphylococcique antérieure.

Lorsque l'on veut obtenir chez un malade un taux d'agglutinines élevé vis-à-vis d'une souche pauvre en agglutinogène commun, cette souche devra être contenue dans le vaccin ; cette condition n'est pas nécessaire si le sujet est infecté par une souche riche en agglutinogène commun.

Ces conclusions, avant d'être adoptées définitivement, devront être confirmées par l'étude de l'absorption spécifique des sérums utilisés dans ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. PILLET, S. ISBIR et P. MERCIER. *Ces Annales*, 1950, **78**, 638.
- [2] J. PILLET, P. MERCIER et B. ORTA. *Ibid.*, 1951, **81**, 224.
- [3] P. MERCIER, J. PILLET et P. CHABANIER. *Ibid.*, 1950, **78**, 457.
- [4] J. PILLET, P. MERCIER et B. ORTA. *Soc. Franç. Microb.*, *Ces Annales*, 1952, **82** (sous presse).

ACQUISITION
DE NOUVELLES PROPRIÉTÉS D'AUTOAGGLUTINATION
DES BACILLES DE KOCH
DÉBARRASSÉS DE LEUR PROPRIÉTÉ
D'ACIDO-ALCOOLO-RÉSISTANCE
SOUS L'ACTION DE FORCES TENSIO-ACTIVES :
LE PROBLÈME DE LA COUCHE « CIREUSE » DU BACILLE

par J. PARAF, J. DESBORDES et Et. FOURNIER.

[Hôpital Bichat, Laboratoire de Recherches phthisiologiques (1).]

Nous utilisons, depuis un certain temps, les propriétés physiques de corps tensio-actifs complexes ou de détergents anioniques purs pour arracher par solvation, les substances lipidiques acido-alcoolo-résistantes de la périphérie des bacilles tuberculeux et para-tuberculeux [1]. Ces phénomènes ont lieu à 18° et à pH = 7.

Divers points particuliers de la physico-chimie de ces germes nous paraissent ainsi être mis en évidence par cette méthode :

a) L'extrême difficulté de délipidation du *Mycobacterium tuberculosis* virulent ;

b) La relative facilité de délipidation des germes para-tuberculeux ;

c) L'existence de forces de cohésion extrêmement intenses entre les corps microbiens du type *Mycobacterium tuberculosis*, virulent.

Mais nous voudrions insister aujourd'hui sur un point particulier. Notons d'abord que l'arrachement par dissolution des substances lipidiques dérivées de l'acido-alcoolo-résistance du bacille de Koch virulent est plus difficile avec un produit anionique pur tel l'Igéal (nomenclature Sisley : lauryl-sulfate concentré pur), qu'avec le mélange tensio-actif complexe contenant du lauryl-sulfate de soude et du dodécylbenzène-sulfonate de soude en solution aqueuse à pH 7. Il faut remarquer également qu'une telle dissolution est beaucoup plus difficile que celle obtenue avec des germes para-tuberculeux [Fléole, bacille F3 (Sartory et coll.)]. En particulier, avec ce dernier, on obtient très facilement des corpuscules granuleux intrabacillaires fortement cyanophiles.

Le phénomène qui nous paraît digne d'un intérêt spécial est le suivant :

Si l'on soumet aux forces tensio-actives précédentes un bacille virulent : *Mycobacterium tuberculosis*, vir. hom. souche Jean Paraf (isolée d'un liquide pleural) en opérant toujours à pH 7 et à 18° selon les modalités déjà décrites [2], on note surtout l'apparition de masses protoplas-

(1) Subventionné par l'INH et la Caisse Nationale de Sécurité Sociale.

miques cyanophiles, ayant l'aspect d'une « purée bacillaire » avec quelques germes rouges isolés. On ne voit que rarement des germes cyanophiles isolés au contour le plus souvent mal défini et semblant moins épais que les rouges.

Dans nos conditions expérimentales (vingt-quatre heures de contact dont cinq d'agitation à pH 7 et à 18°), il reste cependant de grandes plages d'amas de bacilles intacts, fortement serrés les uns contre les autres, d'une apparence toute classique, fortement colorés en rouge.

L'aspect est tout différent si l'on s'adresse à une souche de bacilles para-tuberculeux, telle celle que nous étudions au laboratoire depuis un certain temps : *Mycobacterium phlei*.

Dans des conditions expérimentales identiques, on obtient la quasi-totalité de germes cyanophiles. Seuls de rares petits îlots restent rouges. Mais ce qui est caractéristique, c'est l'abondance des germes bleus isolés ; les plages cyanophiles montrent l'existence, non pas d'une « purée », mais de nombreux germes dont le contour protoplasmique est aisément reconnaissable.

Le BCG se situe entre ces deux extrêmes. Tout se passe comme si, dans le cas de germes virulents, les bacilles délipidés s'accroiaient étroitement les uns aux autres, encore plus qu'à l'état d'acido-alcool-résistance où l'aspect classique des « cordes » et des « moustaches » est déjà cependant typique. Ici, c'est plutôt l'aspect de véritables plages vaguement arrondies, énormes par leur superficie et leur densité bacillaire. Il semble qu'une véritable auto-agglutination de bacilles nus se produise.

Cette observation est à rapprocher de l'opinion de Nine Choucroun qui, faisant intervenir une notion de charge électrique, signale qu'au cours d'opérations (chimiquement fort différentes des nôtres puisqu'il s'agit d'hydrolyse acide, mais conduisant finalement au même résultat) de délipidation, des débris non acido-résistants, véritables squelettes bacillaires, sont moins épais que les germes rouges, et sont attachés les uns aux autres, formant de longs amas, suggérant l'idée que la charge électrique a été changée, sans doute abaissée, ne laissant subsister que d'autres forces physiques d'attraction [3].

De tels faits nous paraissent un argument de plus en faveur de l'existence d'un complexe protéino-glucido-lipidique périphérique, où l'élément lipidique pourrait être représenté par l'acide-alcool-mycolique et divers acides gras, ramifiés ou non. Il ne semble pas que l'on puisse réellement décrire une couche cireuse correspondant à une phase lipidique histologiquement figurée [4].

En conclusion, on peut opposer l'extrême solidité des amas de bacilles de Koch virulents, à une labilité certaine des germes para-tuberculeux et à une labilité relative du BCG. Dans ces deux derniers cas, les amas microbiens se dissocient relativement facilement sous l'influence des corps tensio-actifs.

Au contraire, les amas de bacilles virulents ne se dissocient pas, et jamais (ou rarement) on ne décèle une zone de dégradation à l'intérieur d'un amas microbien.

Alors que l'observation microscopique révèle facilement les nombreux germes qui constituent l'amas, il semble qu'il existe entre eux des forces d'attraction très intenses assez caractéristiques du B. K.

virulent, peut-être à rapprocher du « Cord factor » décrit outre-Atlantique.

Bien plus, ces curieux phénomènes semblent se retrouver quand le germe est « déshabillé ». Les para-tuberculeux, isolés, ne semblent pas voir varier leurs propriétés d'auto-agglutination. Au contraire, les bacilles tuberculeux vrais semblent voir dans cet état augmenter leur pouvoir d'auto-agglutination puisqu'on retrouve, non pas les « moustaches » ou « cordages classiques », mais des masses vaguement circulaires, bien plus denses, véritable purée bacillaire. Ce qui pourrait, en réalité, faire repenser la question du « cord-factor » et la ramener à de plus justes proportions [5], les lipides n'étant pas forcément uniquement en couche externe, mais cénapsés.

De tels faits nous paraissent susceptibles de jouer un rôle très important dans le mode d'infection d'un organisme par le bacille tuberculeux.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. PARAF et coll. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 514.
- [2] J. DESBORDES et Et. FOURNIER. *Ann. Biol. Clin.*, 1951, **9**, 151.
- [3] Voir bibliographie de cette question in J. DESBORDES : *Diagnostic bactériologique des Mycobactéries*. 1 vol. 1951, 33-35. Masson, édit., Paris.
- [4] Voir, pour plus de détails, G. ROMAN : *Le Bacille tuberculeux*. 1 vol., Lyon, 1930.
- [5] Nine CHOUCROUN. Conférence Cornell Research Society. New-York, 12 avril 1948 et communication verbale personnelle.

ÉTUDE SUR LA MÉLITINE

par L. CARRÈRE.

(Laboratoire de Microbiologie. Faculté de Médecine, Centre OMS/OAA de Recherches sur la Brucellose, Montpellier.)

Continuant l'étude sur la mélitine [1], nous avons recherché le pouvoir allergisant de la mélitine par injections successives à des animaux, et essayé de reproduire le phénomène de Shwartzman.

Première expérience. — Injections successives à des animaux. Dix cobayes neufs et 10 cobayes tuberculisés (à intradermo-réaction tuberculinique positive + + +), du poids moyen de 400 g, reçoivent journellement, en injection intradermique, 0,1 ml de mélitine, pendant dix jours. Il n'apparaît aucune réaction décelable aux points d'injections (derme de la région abdominale). Vingt-cinq jours après la dernière injection, il est pratiqué, chez tous les cobayes, une intradermo-réaction à la mélitine. Les cobayes non tuberculisés, comme les cobayes tuberculisés, n'ont présenté aucune réaction visible.

Deuxième expérience. — Six cobayes neufs et 6 cobayes tuberculisés, du poids moyen de 350 g, reçoivent journellement, en injection intradermique, 0,1 ml de mélitine. Vingt-cinq jours après, il est pratiqué chez tous les cobayes une intradermo-réaction à la mélitine

(flanc droit) et une intradermo-réaction à la tuberculine (flanc gauche). Les cobayes non tuberculisés n'ont présenté aucune réaction visible. Les cobayes tuberculisés ont présenté des réactions tuberculiniques (+ + et + + + +) identiques aux réactions tuberculiniques présentées avant toute injection de mélitine. L'intradermo-réaction à la mélitine a été strictement négative.

Troisième expérience. — Six lapins, du poids moyen de 2 kg, ont reçu dans le derme de la région abdominale, pendant dix jours, quotidiennement, 0,1 ml de mélitine, sans présenter la moindre réaction aux points d'injections. Vingt-cinq jours après, une intradermo-réaction à la mélitine a été complètement négative.

PHÉNOMÈNE DE SHWARTZMAN. — *Première expérience.* — Deux lapins MM et MC reçoivent en injection intradermique (région abdominale), 0,2 ml de mélitine.

Deux lapins CC et CM reçoivent, selon la même technique, 0,2 ml d'un filtrat d'une culture de dix jours d'*Escherichia coli* (colitine).

Le lendemain, soit vingt-quatre heures après, les lapins MM et CM reçoivent par voie intraveineuse 1 ml de mélitine. Les lapins MC et CC reçoivent, dans les mêmes conditions, 1 ml de colitine.

Quatre heures après, on constate chez les lapins CM et CC l'apparition d'un phénomène de Shwartzman typique. Les lapins MM et MC n'ont présenté aucune réaction décelable.

Deuxième expérience. — Quatre lapins reçoivent en injection intradermique, dans la région abdominale, du côté droit, 0,2 ml de mélitine, du côté gauche, 0,2 ml de colitine ; vingt-quatre heures après, 2 des lapins reçoivent 1 ml de mélitine en injection intraveineuse, les 2 autres lapins reçoivent, par la même voie, 1 ml de colitine. Quatre heures après, tous les lapins présentent du côté gauche (injection de colitine) un phénomène de Shwartzman typique, tandis que du côté droit (injection de mélitine) on ne note aucune réaction.

La mélitine n'est donc pas « préparante » ; elle est, par contre, « déchainante ». Elle n'est pas allergène, mais réactogène.

Le fait à noter est l'absence de réaction chez les cobayes tuberculisés ; quand on connaît la sensibilité toute particulière de ces animaux aux protéines, on ne peut qu'être frappé de l'inaction de la mélitine. Ce fait va à l'encontre des suggestions de certains auteurs donnant comme non spécifiques des intradermo-réactions à la mélitine positives chez les tuberculeux. Il n'en est certainement rien, notre expérience à cet égard est probante, les réactions à la mélitine sont spécifiques et révèlent l'existence de *Brucella* vivantes en un gîte, que la brucellose, tant humaine qu'animale, ait été évolutive ou soit demeurée occulte ou inapparente [2].

En rappelant d'autres expériences faites sous notre direction [3], la mélitine nous paraît être le « réactogène » spécifique des brucelloses

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. CARRÈRE. Ces *Annales*, 1951, **80**, 101.
- [2] L. CARRÈRE et H. QUATREFAGES. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **44**, 1314-1315.
- [3] G. RENOUX et J. BEDRY. *Rev. Immunol.*, 1951, **15**, 208.

NOUVELLES RECHERCHES SUR LE PHÉNOMÈNE D'ENTRAÎNEMENT DES ANAÉROBIES A LA THERMORÉSISTANCE

par A.-R. PRÉVOT et H. THOUVENOT.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies).

HISTORIQUE. — Meyer et Lang en 1926 [1] ont montré que si on met en contact un anaérobie hautement thermorésistant : *Plectridium caloritolerans*, avec *Cl. botulinum*, celui-ci voit sa thermorésistance à l'ébullition passer de trois cent soixante à quatre cent soixante-dix minutes. Récemment [2], Prévot, Raynaud et Tataki (1951) ont montré que ce phénomène, tout en n'étant pas général, n'est pas localisé au couple *Pl. caloritolerans* et *Cl. botulinum*, puisqu'ils l'ont mis en évidence pour un nouveau couple : *Cl. sporogenes* var. *stavan-gerensis* et *W. perfringens*. En effet, après un contact entre ces deux anaérobies, la thermorésistance à l'ébullition de *W. perfringens* passe de trois à trente minutes. Ils ont montré, de plus, que la substance entraînant se trouve primitivement dans les corps microbiens et diffuse secondairement dans les cultures.

INTRODUCTION. — Le présent travail a eu pour objet l'étude d'un nouveau couple d'anaérobies présentant ce phénomène. La différence essentielle que ce couple présente avec les précédents c'est qu'il existait naturellement et n'est pas une association artificielle de souches de collection : en effet, il a été isolé par J. Meyer, J. Malgras et N. Aladame [3] de conserves de choucroute garnie ayant résisté à la stérilisation et comprenait : *Cl. valerianicum* souche 682 A dont la thermorésistance propre à l'ébullition est inférieure à dix minutes, et *Cl. valerianicum* var. *strasbourgensis* souche 682 B dont la thermorésistance est de quatre heures à 100°.

Comme le font remarquer ces auteurs dans leur note, il est permis de penser que c'est la présence de cette variété hautement thermorésistante qui a conféré par contact la résistance induite à la souche normale et lui a permis de résister à la stérilisation à l'autoclave.

PARTIE EXPÉRIMENTALE. — Il s'agissait tout d'abord de voir si, dans les conditions expérimentales où Prévot, Raynaud et Tataki s'étaient placés, on pouvait reproduire cette induction. Le matériel actuel nous présentait *a priori* des conditions idéales pour de telles expériences, car cette espèce et sa variété sporulent rapidement et très abondamment ; déjà dans les cultures de vingt-quatre heures on observe un très grand nombre de spores libres.

I. — Dans une première série d'expériences nous avons mis deux cultures de vingt-quatre heures de *Cl. valerianicum* en contact, l'une

deux heures et demie, l'autre quatre heures avec un filtrat rigoureusement stérile de culture de quatre jours de la variété *strasbourgensis*. Après le contact de deux heures et demie, la thermorésistance de la souche entraînée passe de dix minutes à quarante minutes. Après le contact de quatre heures elle atteint quatre-vingt-dix minutes.

Dès cette première série d'expériences nous avons constaté un fait que nous jugeons très important et dont nous proposons dans la discussion une interprétation : c'est une certaine irrégularité du phénomène. Par exemple, sur les trois tubes chauffés pendant soixante minutes, un n'a pas résisté, et sur les 3 tubes chauffés pendant quatre-vingt-dix minutes, 2 n'ont pas résisté.

II. — Dans une deuxième série d'expériences nous avons cherché s'il était possible de voir dans quelle fraction du filtrat se trouve la substance entraînée. Pour cela nous avons précipité 1 l de ce filtrat par le sulfate d'ammonium et un autre litre par l'éthanol. Nous avons recueilli dans l'un et l'autre cas un abondant précipité que nous avons soigneusement essoré, desséché dans le vide sulfurique et pulvérisé. Repris par l'eau physiologique à un taux de concentration voisin de 100, chacun de ces précipités a été mis en contact quatre heures avec une culture de vingt-quatre heures de *Cl. valerianicum*. On constate après les opérations de chauffage que le précipité par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ provoque un entraînement de la thermorésistance qui passe de dix à soixante minutes, et que le précipité éthanolique contient aussi la substance entraînée, qui fait passer la thermorésistance de dix à quatre-vingt-dix minutes. Mais, ici encore, nous retrouvons l'irrégularité du phénomène signalée au chapitre précédent : dans le premier cas, 1 tube sur 2 a résisté à soixante minutes ; dans le deuxième cas, 1 tube sur 2 a résisté à quatre-vingt-dix minutes, alors que les 2 tubes chauffés soixante minutes sont tous deux stérilisés.

Nous concluons, de cette deuxième série d'expériences, que la substance entraînée est précipitée en même temps que les grosses molécules protidiques du filtrat.

III. — Dans une troisième série d'expériences nous avons voulu voir si ce phénomène, en quelque sorte naturel et spontané, pouvait être reproduit avec les souches de collection. Nous possédons dans notre collection 8 autres souches de *Cl. valerianicum*. Nous en avons éliminé une d'emblée parce qu'elle possédait une thermorésistance propre de trente minutes à 100°, ce qui la place en position intermédiaire entre l'espèce normale et la variété *strasbourgensis*. Restent 7 souches dont les cultures ont été soumises à un contact de quatre heures avec le filtrat de *strasbourgensis*. Sur ce total, 6 n'ont subi aucune augmentation de thermorésistance. Mais la souche O22 A a subi une augmentation de thermorésistance du même ordre que la souche 682 A étudiée plus haut. Ainsi le phénomène naturel observé avec le couple 682 A et 682 B n'est reproductible qu'une fois sur sept avec des souches de collection appartenant à la même espèce.

DISCUSSION. — Étant donné que dans les expériences relatées ci-dessus la thermorésistance induite par contact avec une substance entraînée ne se manifeste qu'autant qu'elle est en contact et disparaît dès que le contact cesse, on ne peut pas penser à une mutation induite par ladite

substance, car une telle mutation persisterait après la cessation du contact. Mais l'irrégularité essentielle du phénomène qui s'est révélée au cours des trois séries d'expériences nous oblige à en formuler une interprétation : *le phénomène d'entraînement ne se produit que dans les tubes où existent les spores réceptives à l'induction.*

Dans les séries I et II où les souches en contact proviennent d'une association naturelle, cette irrégularité ne se manifeste que rarement et seulement par quelques tubes non stérilisés à côté d'autres stérilisés par l'ébullition. Mais dans la série III, où les souches mises en contact avec la substance entraînant proviennent de collection, on n'observe qu'une seule souche possédant des spores munies du récepteur. Cette proportion de 1 sur 7 donne une idée approximative de l'aspect statistique du phénomène et confirme ce qui a été dit précédemment : ce n'est pas un phénomène général.

CONCLUSIONS. — 1° La variété *strasbourgensis* élabore dans les cultures de quatre jours une substance entraînant faisant passer la thermorésistance de *Cl. valerianicum* de dix à quatre-vingt-dix minutes à l'ébullition.

2° Cette substance est précipitable par le sulfate d'ammonium et par l'éthanol.

3° Le phénomène d'entraînement est déjà irrégulier avec un couple isolé dans la nature. Il l'est encore plus quand on substitue à la souche naturelle des souches de collection. Ceci implique l'hypothèse de l'existence, dans la même culture, de spores réceptives et de spores non réceptives à l'entraînement, et, dans une collection de souches appartenant à la même espèce, de souches réceptives et de souches non réceptives.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. MEYER et LANG, cités par WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. *Les Microbes anaérobies*, 304.
- [2] A.-R. PRÉVOT, M. RAYNAUD et H. TATAKI. *Ces Annales*, 1951, **80**, 553.
- [3] J. MEYER, J. MALGRAS et N. ALADAME. *Ces Annales*, 1952, **82**, 240.

SYMBIOSE ENTRE LE VIRUS COXSACKIE, SOUCHE ENCÉPHALITOGÈNE, ET LE VIRUS DE LA RAGE DES RUES (SOUCHE TANGER)

par C. LEVADITI, A. VAISMAN et J. HENRY-EVENO.

(Institut Alfred-Fournier.)

Comme suite à nos recherches concernant la possibilité de symbiose entre le virus Cocksackie, souche encéphalitogène B de Dalldorf et Sickles [1], et d'autres virus neurotropes (tels le virus poliomyélique

souche Lansing [2], le vaccin jennérien [3], le virus lymphogranulomateux [4], ceux de la maladie de Theiler [5], de la fièvre aphteuse neurotrope [6] et de l'herpès [7]), nous avons entrepris des essais analogues sur l'association Coxsackie-Rage des rues.

Technique. — Un mélange à parties égales d'émulsions d'encéphales de souriceaux (771 à 776) morts d'encéphalite Coxsackie et ayant présenté des altérations typiques intenses [8], d'une part, du cerveau d'un lapin atteint de rage des rues, souche Tanger, éminemment négroïde, d'autre part, est, après dilution au 1/10, inoculé à des souriceaux nouveau-nés et à des souris adultes. De telles souris adultes, résistantes à l'ultravirus Coxsackie, servent de test de la présence du virus rabique. Des passages réguliers sont pratiqués de souriceaux à souriceaux et à souris adultes. L'encéphale de tous ces sujets est examiné du point de vue lésionnel et de sa teneur en corps de Negri [méthode de Mann et de C. Levaditi et Dunoyer (1), (fixation au Carnoy)]. Ci-après l'ensemble de nos constatations.

I. PRIMO-INOCULATION. — a) *Souriceaux* (au nombre de 7). — Morts ou sacrifiés malades le quatrième jour. Lésions Coxsackie positives (+ à ∞ : 7/7 (2)), absence de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — Mortes ou sacrifiées malades le huitième jour. Lésions rabiques positives (+ à ∞ : 5/5) et présence de corps de Negri chez 4 animaux sur 5 (4/5).

II. PREMIER PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 4). — Morts ou sacrifiés malades le troisième jour. Lésions Coxsackie positives (+ à ∞ : 4/4), absence de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — Mortes entre le neuvième et le dixième jour. Altérations rabiques positives (+ à ∞ : 4/5), présence de corps de Negri (+ — à ++ : 4/5).

III. SECOND PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 7). — Morts les deuxième et troisième jours. Lésions Coxsackie positives (+ à ∞ : 4/7), absence de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — *Survie*.

IV. TROISIÈME PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 4). — Morts les deuxième et troisième jours. Lésions Coxsackie positives (+ à ∞ : 3/4), absence de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — *Survie* ou mortes les quatrième et onzième jours. *Absence de lésions rabiques et de corps de Negri chez les sujets morts.*

V. QUATRIÈME PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 5). — Morts le quatrième jour. Altérations Coxsackie positives (+ à ∞ : 4/5), absence de corps de Negri.

(1) C. LEVADITI, Monographie de l'Institut Alfred-Fournier, 1944.

(2) Ici, comme dans le tableau ci-joint, le chiffre placé à droite du trait indique le nombre total de sujets en expérience, celui placé à gauche de ce même trait correspond au nombre d'animaux présentant des altérations.

TABLEAU I.

PRIMO- INOCULATION et PASSAGES	VIRUS COXSACKIE (Souriceaux)					VIRUS RABIQUE TANGER (Souris adultes)				
	Nombre d'animaux	Morts (M) ou sacrifiés (S) le :	Lésions Coxsackie		Corps de Negri	Nombre de souris	Mortes (M) ou sacrifiés (S) le :	Lésions rabiques		
			0 à + -	+ à ∞				0 à + -	+ à ∞	Corps de Negri
<i>Primo- inoculation.</i>	7	M : 4° j. S : 4° j.	0/7	7/7	0/7	5	M : 8° j. S : 8° j.	0/5	5/5	+++ à ∞
<i>Premier passage.</i>	4	M : 3° j. S : 3° j.	0/4	4/4	0/4	5	M : 9° à 10° j.	1/5	4/5	4/5 +- à ++
<i>Deuxième passage.</i>	7	M : 2° à 3° j.	3/7	4/7	0/7	5	Survie.	0	0	4/5
<i>Troisième passage.</i>	4	M : 2° à 3° j.	1/4	3/4	0/4	5	Survie et M : 4° et 11° j.	0	0	0
<i>Quatrième passage.</i>	5	M : 4° j.	1/5	4/5	0/5	5	Survie.	0	0	0
<i>Cinquième passage.</i>	8	M : 2° j.	5/8	3/8	0/8	4	Survie.	0	0	0
<i>Sixième passage.</i>	8	M : 2° j. S : 3° et 4° j.	1/8	7/8	0/8	5	Survie.	0	0	0

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — *Survie indéfinie*.

VI. CINQUIÈME PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 8). — Morts le deuxième jour. Lésions Coxsackie positives chez 3 sujets sur 8 (+ à ∞ : 3/8), absence de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 4). — *Survie indéfinie*.

VII. SIXIÈME PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 8). — Morts le deuxième jour ou sacrifiés malades les troisième et quatrième jours. Lésions Coxsackie positives (+ à ∞ : 7/8), absence de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — *Survie indéfinie*.

L'ensemble de ces résultats est condensé dans le tableau I.

CONCLUSIONS. — La symbiose entre le virus Coxsackie encéphalitique (souche B de Dalldorf et Sickles) et celui de la rage des rues (souche Tanger) a été effective lors de la primo-inoculation et du premier passage sur souriceaux, soit pendant sept jours. Par la suite, la pullulation intense du premier de ces ultra-germes et les altérations neuroniques térébrantes qu'il provoque dans l'encéphale des souris nouveau-nées se sont rapidement opposées au développement du virus rabique des rues, lequel, cela va sans dire, se multiplie normalement chez les souriceaux lorsqu'il est seul inoculé.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DALLDORF et SICKLES. *Science*, 1948, **108**, 61 ; *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 329.
- [2] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *Ces Annales*, 1951, **80**, 678.
- [3] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1614.
- [4] C. LEVADITI, A. VAISMAN et DUNOYER. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1234.
- [5] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *Ces Annales*, 1951, **81**, 207.
- [6] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *Ces Annales*, 1951, **81**, 210.
- [7] C. LEVADITI, A. VAISMAN et HENRY-EVENO. *Rev. Immunol.*, 1952, sous presse.
- [8] Voir, au sujet des principales caractéristiques de ces lésions : C. LEVADITI. *Ces Annales*, 1951, **81**, 260.

SYMBIOSE ENTRE LE VIRUS COXSACKIE, SOUCHE ENCÉPHALITOGÈNE, ET LE VIRUS RABIQUE FIXE

par C. LEVADITI, A. VAISMAN et J. HENRY-EVENO.

(Institut Alfred-Fournier.)

Comme suite à nos expériences concernant la possibilité de symbiose entre le virus Coxsackie encéphalitique (souche B de Dalldorf et Sickles [1]) et celui de la rage des rues (souche Tanger, négrigène [2]),

nous avons effectué des essais analogues avec ce même ultra-germe Cocksackie et le virus rabique fixe (Pasteur ; n° 11745). Ce dernier ultra-virus, inoculé par voie intracérébrale à des souris adultes, provoque la rage après une incubation de six à sept jours, avec des altérations microscopiques névrauxiques caractéristiques (méningite monocytaire, périvascularite à lymphocytes, neuronophagie et neuronolyse oxyphile des cellules nerveuses de la corne d'Ammon, foyers évolutifs d'encéphalite aiguë parenchymateuse, absence de corps de Negri).

Technique. — La même que celle utilisée dans les expériences concernant le virus rabique des rues. Le virus Cocksackie provenait du cerveau de souriceaux infectés par voie transcranienne et morts le deuxième jour ; celui de la rage avait comme origine des encéphales de souris adultes mortes du sixième au septième jour. L'utilisation de telles souris adultes a servi de test de la présence du virus de la rage dans l'association, point de départ de nos investigations. Ci-après les résultats enregistrés.

I. PRIMO-INOCULATION. — a) *Souriceaux* (au nombre de 7). — Morts le troisième jour. Lésions Cocksackie positives (+ à ∞ : 7/7). Absence de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — Mortes les sixième et huitième jours. Lésions rabiques positives (+ à ∞ : 5/5). Absence de corps de Negri).

II. PREMIER PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 5). — Morts les troisième et quatrième jours. Altérations Cocksackie positives (+ à ∞ : 5/5). Absence de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — Mortes les septième et huitième jours. Altérations rabiques positives (+ à ∞ : 5/5). Absence de corps de Negri.

III. SECOND PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 8). — Morts le quatrième jour. Lésions Cocksackie positives (+ à ∞ : 8/8). Pas de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — Mortes les septième et huitième jours. Altérations rabiques positives (+ à ∞ : 5/5). Absence de corps de Negri.

IV. TROISIÈME PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 5). — Morts le quatrième jour. Lésions Cocksackie positives (+ à ∞ : 5/5). Pas de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — Mortes le huitième jour. Altérations rabiques positives (+ à ∞ : 5/5). Absence de corps de Negri.

V. QUATRIÈME PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 8). — Morts les troisième et quatrième jours. Lésions Cocksackie positives (+ à ∞ : 8/8). Absence de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 4). — Mortes les septième et neuvième jours. Lésions rabiques positives (+ à ∞ : 4/4). Pas de corps de Negri.

TABLEAU I.

PRIMO- et PASSAGES	VIRUS COXSACKIE (Souriceaux)				VIRUS RABIQUE FIXE (Souris adultes)			
	Nombre d'animaux	Morts (M) le :	Lésions Coxsackie		Nombre de souris	Mortes (M) ou survivantes (S) le :	Lésions rabiques	
			0 à + —	+ à ∞			0 à + —	+ à ∞
<i>Primo- inoculation.</i>	7	M : 3° j.	0	7/7	5	M : 6° à 8° j.	0	5/5
<i>Premier passage.</i>	5	M : 3° et 4° j.	0	5/5	5	M : 7° à 8° j.	0	5/5
<i>Deuxième passage.</i>	8	M : 4° j.	0	8/8	5	M : 7° à 8° j.	0	5/5
<i>Troisième passage.</i>	5	M : 4° j.	0	5/5	5	M : 8° j.	0	5/5
<i>Quatrième passage.</i>	8	M : 3° et 4° j.	0	8/8	4	M : 7° à 9° j.	0	4/4
<i>Cinquième passage.</i>	7	M : 5° j.	0	7/7	5	2 M le 9° j. 3 S	0 3/5	2/5
<i>Sixième passage.</i>	5	M : 3° et 4° j.	0	5/5	5	S	0 5/5	0
<i>Septième passage.</i>	6	M : 3° et 4° j.	4	2/6	4	S	0 4/4	0
<i>Huitième passage.</i>	7	M : 2° et 3° j.	2	5/7	4	S	0 4/4	0

VI. CINQUIÈME PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 7). — Morts le cinquième jour. Altérations Cocksackie positives (+ à ∞ : 7/7). Absence de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — 2 mortes le neuvième jour, 3 survivantes indéfiniment. Lésions rabiques positives (+ à ∞ : 2/5) ; négatives (0 : 3/5). Absence de corps de Negri.

VII. SIXIÈME PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 5). — Morts les troisième et quatrième jours. Lésions Cocksackie positives (+ à ∞ : 5/5). Pas de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 5). — *Survie indéfinie*.

VIII. SEPTIÈME PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 6). — Morts les troisième et quatrième jours. Lésions Cocksackie positives chez 2 sujets (+ à ∞ : 2/6) ; négatives chez 3 autres (0 : 3/6). Pas de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 4). — *Survie indéfinie*.

IX. HUITIÈME PASSAGE. — a) *Souriceaux* (au nombre de 7). — Morts les deuxième et troisième jours. Lésions Cocksackie positives chez 5 sujets (+ à ∞ : 5/7). Absence de corps de Negri.

b) *Souris adultes* (au nombre de 4). — *Survie indéfinie*.

L'ensemble de ces données se trouve résumé dans le tableau ci-contre.

CONCLUSIONS. — La symbiose des virus Cocksackie et Rage fixe dans l'encéphale des souriceaux a été effective lors de la primo-inoculation et des 5 passages ultérieurs, pendant un laps de temps de vingt-sept jours. Toutefois, au cours du cinquième transfert, une atténuation de l'ultra-germe rabique est apparue (résultat positif chez 2 sujets seulement sur 5). C'est au sixième passage que le virus rabique a disparu radicalement ; son absence totale a été constatée lors des sixième, septième et huitième passages. Il en résulte que l'ultra-virus Cocksackie, du fait de sa pullulation dans le névraxe des souriceaux et des altérations histologiques térébrantes qu'il y provoque, a fini par supplanter le virus rabique de l'association Cocksackie-Rage fixe. A signaler, également, un certain amoindrissement de l'activité pathogène du virus Cocksackie chez les souriceaux lors des deux derniers transferts. Une comparaison entre les virus rabiques des rues et fixe (voir la note précédente) montre que l'anéantissement du premier de ces virus au sein du complexe Cocksackie-Rage s'effectue plus précocement que celui du second (1).

BIBLIOGRAPHIE

- [2] C. LEVADITI, A. VAISMAN et J. HENRY-EVENO. *Ces Annales*, 1952, **82**, 499.
26, 329.
[4] C. LEVADITI, A. VAISMAN et J. HENRY-EVENO. *Ces Annales*, 1952, **82**, 473.

(1) Des recherches faisant l'objet d'un mémoire à paraître prochainement dans la *Revue d'Immunologie* (1952, sous presse) montrent qu'une symbiose entre le virus Cocksackie et celui de l'herpès est possible au cours de 14 passages intra-névraux chez les souriceaux.

OBSERVATION AU MICROBIOPHOTOMÈTRE DE L'ACTION DE LA PARA-OXY-PROPIOPHÉNONE SUR LA CROISSANCE MICROBIENNE

par M. FAGUET et E. EDLINGER.

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage et C. N. R. S.)

On sait que la para-oxy-propionophénone a été présentée comme frénateur hypophysaire de synthèse. Préparée par N. P. Buu-Hoï [1, 2], cette substance a suscité dans la cancérologie un intérêt considérable : (Perrault [3], Huguenin et coll. [4], Lacassagne et coll. [5]).

Nous nous sommes demandé si ce produit n'exercerait pas une

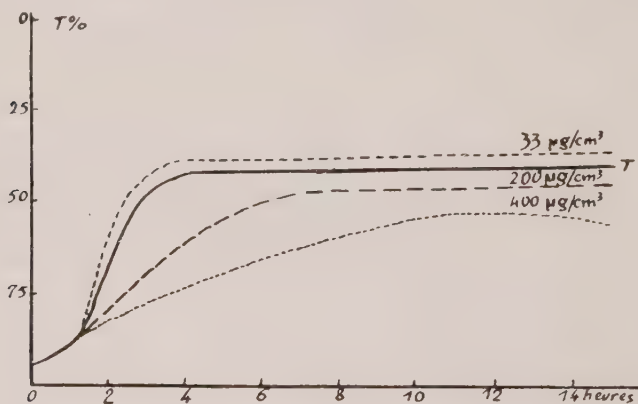


FIG. 1. — Culture du staphylocoque blanc. Culture-témoin T (trait plein). Les courbes en pointillé montrent la croissance avec différentes doses de para-oxy-propionophénone.

action sur la croissance bactérienne et, dans ce but, nous avons entrepris les recherches suivantes :

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Comme cultures bactériennes, nous avons utilisé *Staphylococcus albus* Twort et *Escherichia coli*, souche B. Ces deux germes provenaient de la collection du Service de Bactériologie de l'Institut Pasteur.

Les milieux utilisés étaient d'une part l'eau peptonée à 1 p. 100 (peptone UCLAF) le plus souvent additionnée de 1,5 p. 100 de glucose, d'autre part un milieu synthétique pour *E. coli* : KH_2PO_4 , 13,6 ;

KCl 0,5 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,75 g ; MgSO_4 0,05 g, FeCl 0,0001 g et CaCl 0,0001 g pour 1 000 cm^3 d'eau distillée (pH 7,4).

L'observation de la croissance des cultures a été faite à l'aide du microbiophotomètre de M. FAGUET. Les 6 tubes du microbiophoto-

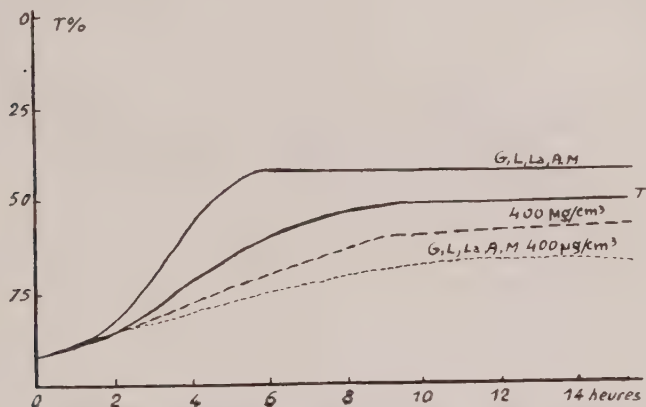


FIG. 2. — Culture du staphylocoque blanc. En traits pleins : cultures témoins. (G, glucose ; L, lévulose ; La, lactose ; A, arabinose ; M, maltose à 1,5 p 100 ; T, sans glucides). En pointillé : 400 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de H. 365.

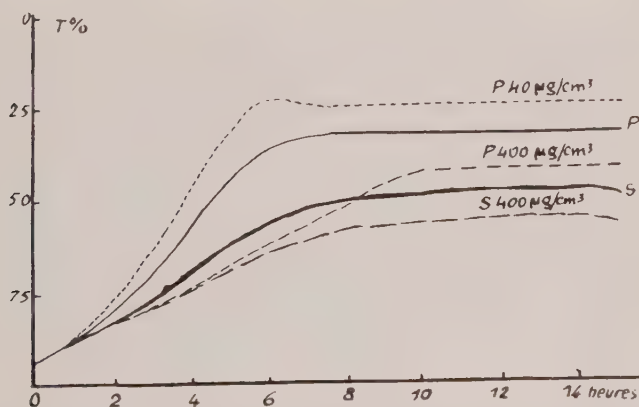


FIG. 3. — Culture de l'E. coli B. En traits pleins : croissance témoin. P, eau peptonnée à 1 p. 100 ; S, milieu synthétique. En pointillé : culture avec de la para-oxy-propionophénone.

mètre, contenant chacun 2 cm^3 de milieu, étaient ensemencés avec environ 500 000 germes par centimètre cube provenant d'une culture de dix-huit heures sur gélose inclinée. La température était de 37° C et les cultures étaient agitées et aérées.

Le produit à examiner était le frénantol (H. 365) en solution saturée

dans l'eau distillée. Cette solution, qui correspondait à une dilution au 1/3 000, donc 1 cm³ de la solution-mère, contenait environ 0,3 mg du produit.

EXPÉRIENCES. — Les premières expériences ont été effectuées avec le staphylocoque. Une expérience type est représentée par la figure 1. De faibles doses du produit semblent favoriser la croissance bactérienne, qui est légèrement plus rapide et plus intense que la culture-témoin ; des concentrations plus élevées cependant provoquent l'effet contraire : la densité optique reste plus faible, son augmentation est plus lente. Précisons que, sans aération du milieu, le fond des tubes qui recevaient le frénantol est beaucoup plus clair que la partie supérieure de la culture. Ce phénomène mériterait d'être étudié d'une manière plus approfondie.

Dans d'autres expériences, nous avons utilisé comme milieu de culture l'eau peptonée non sucrée ou contenant divers glucides (fig. 2). Le résultat a été inattendu : les effets du H. 365 ont été plus marqués dans les cultures avec glucides favorisant la croissance que dans les cultures sans glucides.

Avec *E. coli* B (fig. 3), les résultats des expériences ont été semblables. En eau peptonée, la culture avec une faible dose de H. 365 a été très légèrement supérieure à la culture-témoin, tandis que les plus fortes doses du produit ont ralenti la croissance bactérienne. Mais la culture en milieu synthétique a été beaucoup moins touchée par l'action inhibitrice du frénantol.

DISCUSSION. — Ainsi, la para-oxy-propionophénone possède, en plus de ses activités normales, une action favorisante à faibles doses et une action empêchante pour les concentrations plus fortes sur la croissance bactérienne. Or, les doses utilisées sont de l'ordre du microgramme, donc déjà très significatives. Le degré de l'activité du produit dépend du milieu dans lequel les bactéries se développent. Les milieux les plus riches sont ceux pour lesquels l'activité est la plus forte ; mais il ne s'agit pas d'une action sur le métabolisme des glucides, ni sur celui des substances peptidiques seules, parce que ce n'est pas la qualité de la substance nutritive qui détermine l'action ; d'après nos expériences, c'est uniquement la quantité de substances nutritives qui entre en jeu. Il nous paraît nécessaire de continuer l'étude de cette question, mais nous désirons, en communiquant ces résultats, signaler dès maintenant l'action sur les cultures bactériennes d'un produit synthétique doué pour les mammifères d'une action hormonale.

RÉSUMÉ. — Nos observations au microbiophotomètre montrent que la para-oxy-propionophénone favorise à faibles doses (40 µg/cm³) la croissance du staphylocoque blanc et de *E. coli* B, tandis que les doses plus fortes (200 µg/cm³ et plus) ralentissent la croissance de ces germes. Plus le milieu est riche en substances nutritives, plus l'action du produit est marquée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] N. P. BUU-HOÏ. *Rev. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1949, **68**, 759.
- [2] N. P. BUU-HOÏ, L. CORRE, M. DE CLERCQ, Ng. HOAN, A. LACASSAGNE.

- R. ROYER et Ng. D. XUONG. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, **32**, 255.
[3] M. PERRAULT, *Presse Méd.*, 1951, **59**, 353.
[4] R. HUGUENIN, H. HINGLAIS, M. HINGLAIS et N. ROUGEOL. *Bull. Assoc. franç. étude Cancer*, 1951, **38**, 177.
[5] A. LACASSAGNE, A. CHAMARRO et N. P. BUU-HOÏ. *Presse Méd.*, 1951, **59**, 1413.

LE CONFLIT CELLULES-MICRO-ORGANISMES EN FONCTION DE L'INFECTION ET EN RAPPORT AVEC LES NUMÉRATIONS DES LEUCOCYTES

par L. DUCHON.

(Laboratoire de Secteur. Hôpital Trousseau.)

Lors de notre exposé sur la méthode d'étude et de mesure du conflit cellules-micro-organismes [1] nous avons souligné que « les résultats de cette méthode étaient valables pour l'heure de la prise de sang, car ils sont fonction de conditions à la fois bactériologiques et biologiques de l'individu ».

Les conditions bactériologiques seules nous intéresseront aujourd'hui.

Dans cet exposé, en étudiant la sensibilité, nous avons remarqué que pour un pathogène déterminé, entre différents sangs, l'on pouvait avoir des réponses fixées par des chiffres indiquant des différences extrêmement marquées. Nous allons en percevoir les raisons.

Précisons que toute l'expérimentation qui va suivre porte sur 9 tubes de 1 cm³ de sang défibriné.

1° 3 tubes recevront 1 goutte de la suspension microbienne du pathogène répondant à la lésion observée, mais à dose élevée : 1/50 d'une culture sur bouillon T de vingt heures.

2° Des 6 autres tubes, 3 seront chauffés à 48°. Tous recevront 1 goutte de la même suspension microbienne, mais à faible dose : 1/3 000 pour établir l'indice d'activité cellulaire [2] (1).

Et conformément à la méthode : agitation, huit heures d'étuve, ensemencement sur plaques.

(Cette double expérimentation pour chaque sang fait un peu double emploi, mais la première nous révèle avec plus de précision l'activité de la phagocytolyse, de plus elles se vérifient l'une l'autre.)

Examinons donc, dans ces conditions, des sangs de différentes catégories.

1° Sangs provenant de porteurs de lésions microbiennes, mais lésions

(1) Ces dilutions sont celles de certaines de nos souches pathogènes, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus hemolyticus*, de virulence moyenne, que nous utilisons couramment.

récentes, moins d'un mois (le furoncle, lésion pure et précise dans son apparition et son évolution, nous paraît la lésion idéale pour cette étude).

La réponse de ces sangs est *invariable* : toujours les cultures sont pauvres tendant vers la stérilité. Donc phagocytolyse très active et toujours l'indice est élevé, très élevé.

2° Sangs provenant de porteurs de lésions microbiennes anciennes, vieilles de plusieurs mois ou années (l'ulcère de jambe, variqueux ou non, nous paraît ici particulièrement bien indiqué. Après identification de la flore, l'on pourra utiliser indifféremment le plus souvent le *Staphylococcus aureus* ou le *Streptococcus hemolyticus*).

Les réponses de ces sangs sont les suivantes : avec une grande fréquence, les cultures sont riches et souvent *extrêmement riches*. Donc phagocytolyse peu active, l'indice est faible ou très faible.

3° Sangs provenant de donneurs sains, c'est-à-dire non porteurs de lésions microbiennes *apparentes*.

Les réponses ont différents aspects :

Souvent les cultures sont de richesse moyenne. La phagocytolyse est d'une activité modérée. L'indice n'est ni très élevé ni très bas.

Mais on peut observer toute la gamme. En voici la principale raison :

Revenons à notre première expérimentation sur les sangs des porteurs de lésions microbiennes récentes et suivons, jour par jour peut-on dire, l'évolution de l'activité de la phagocytolyse :

a) Dès les tout premiers jours, voire premières heures, on observe une chute brutale du nombre des colonies (l'activité croît très rapidement) ;

b) Les jours suivants, la pauvreté des cultures paraît s'équilibrer ; l'activité est stable ;

c) Au fur et à mesure de la disparition de la lésion, la richesse des cultures s'accroît pour remonter petit à petit au palier de départ (excellent témoin de stérilisation bactériologique du terrain) ; l'activité décroît ;

d) Mais qu'une nouvelle lésion apparaisse, *la plus petite folliculite*, immédiatement nouvelle inflexion brutale et profonde vers la pauvreté des cultures. Soulignons ici que nous retrouvons l'extrême sensibilité de l'activité de la phagocytolyse.

Et soulignons encore que cette sensibilité est telle qu'il suffit de devenir simple *porteur de germes* pour retrouver cette même manifestation très franche. Ce qui explique avec précision les variations les plus apparentes que nous venons de signaler dans la gamme des donneurs apparemment sains.

Cette étude conjointe peut être réalisée aisément par la recherche des porteurs de streptocoques hémolytiques (au moyen des géloses au sang humain) : les sangs de donneurs « sains » accusant une phagocytolyse active, un indice élevé, révèlent toujours un porteur de streptocoques hémolytiques et point n'est besoin de nombreuses colonies.

On conçoit aisément que les notions précédentes puissent comporter une réciproque : *l'étude du conflit cellules-micro-organismes du sang d'un porteur d'une offensive microbienne récente, en présence de plusieurs germes pathogènes, pourra déceler lequel a des chances d'être l'auteur de cette offensive.*

Il nous paraît ici indiqué de confronter schématiquement les courbes d'activité de la phagocytolyse et, d'autre part, les courbes des phagocytes (somme polynucléaires, monocytes) observées en parallèle.

Tout d'abord, nulle comparaison possible dans l'amplitude de ces courbes : quand un porteur de germes infléchit violemment sa courbe d'activité, il ne s'ensuit pas évidemment pour autant une modification apparente dans les numérations des leucocytes.

Toutefois, après de nombreuses lectures, il semble que l'on puisse exprimer ce qui suit :

a) Sang de porteur d'une infection par pyogènes récente, à indice élevé : la courbe des numérations des phagocytes subit des variations exactement inverses de celles des richesses des cultures.

b) Sang de porteur d'une infection par pyogène ancienne, à indice bas : la courbe des numérations des phagocytes, rectiligne, peu élevée, avec tendance à la raréfaction de ces cellules, marche de pair avec la tendance aux cultures d'autant plus riches.

Dans cette confrontation, l'activité de la phagocytolyse et le dénombrement des phagocytes paraissent donc mutuellement expliquer leurs variations. Parfois incomplètement en raison du peu de similitude de l'amplitude des phénomènes (porteurs de germes), mais aussi, d'autres fois, avec une facile précision : les mononucléoses donnent toujours des chiffres dénonçant la faible activité de la phagocytolyse, faiblesse favorisée tout particulièrement dans la leucémie lymphoïde dont l'indice est parmi les plus bas, voisins ou égaux à 1.

Une perturbation dans ces notions semble impliquer une perturbation de la fonction cellulaire, et à toutes ces données nous ajouterons une réserve : elles sont valables hormis pour les sangs soumis à une intoxication ou intoxication, en particulier, hormis pour les sangs sous influence des antibiotiques. Nous reviendrons ultérieurement sur ces conditions biologiques.

En résumé : l'étude conjointe de la phagocytolyse d'un sang et de l'état bactériologique du donneur permettent de révéler des relations extrêmement étroites et d'amplitude bien supérieure à ce que l'on observe dans les numérations et formules leucocytaires.

BIBLIOGRAPHIE

[1] L. DUCHON. *Ces Annales*, 1952, **82**, 228.

[2] L. DUCHON. *Ces Annales*, 1952, **82**, 254.

**A PROPOS D'UN BACILLE PATHOGENE
POUR LES VERS A SOIE AU JAPON
(*BACILLUS SOTTO*) [ISHIWATA] ET SES AFFINITES
AVEC D'AUTRES BACILLES ENTOMOPHYTES**

par C. TOUMANOFF.

(Institut Pasteur. Service de Pathologie des Insectes.)

Parmi les bacilles pathogènes pour les insectes lépidoptères « per os » se trouvent, entre autres, *Bacillus thuringensis* Berliner, isolé en 1911 par Berliner, en Allemagne, des chenilles de la mite de farine *Ephestia kühniella* Zeller et reconnu plus tard comme une forme de *Bacillus cereus* Frankl. et Frankl. [3, 10].

En ce qui concerne les vers à soie, Ishiwata, en 1902, isola d'un cas de forte dysenterie des vers à soie un germe pathogène « per os » qu'il désigna sous le nom de *Bacillus sotto*. Ce même microbe était isolé plus tard par Aoki et Chigasaki (1915), qui l'ont étudié et comparé avec *B. megatherium* en concluant qu'il possède des affinités avec cette espèce bactérienne [4, 2].

Comme le note Steinhaus dans son ouvrage sur la pathologie des insectes, l'identité de cette forme n'a cependant jamais été établie exactement [12].

Aoki et Chigasaki ont toutefois constaté qu'il existait deux formes du *B. sotto* : l'une très pathogène pour les vers à soie et l'autre non, en définissant la première souche comme « toxigène » et l'autre comme « non toxigène ».

Ainsi, nous avons cru intéressant d'entreprendre l'étude de cette espèce, et plus spécialement de la souche virulente pour les vers à soie au Japon, qui nous a été aimablement donnée par le Dr Chigasaki (1).

Nous avons aussi étudié la souche de *Bacillus thuringensis* reçue d'Amérique (de provenance allemande) ainsi que celle de France qui était conservée dans la collection de Chorine à l'Institut Pasteur de Paris, afin d'établir leurs affinités, ce qui ne fut fait jusqu'ici que d'après leur description.

Voici tout d'abord la description de *Bacillus sotto* (Ishiwata) :

En culture jeune, soit sur gélose, soit sur pomme de terre, le bacille

(1) Cette souche, qualifiée comme « toxigène » et virulente, nous a été envoyée par M. le Dr Ishimori qui l'a obtenue du Dr Chigasaki et nous est parvenue grâce à l'amabilité du Dr McCoy de la Fondation Rockefeller qui se trouvait en 1949 à Tokio. Nous tenons à leur adresser ici nos remerciements.

se présente sous l'aspect de filaments enchevêtrés. Les éléments libres ou ceux faisant partie des chaînettes mesurent de $3\ \mu$ à $4\ \mu$, rarement davantage.

La croissance sur gélose est sous l'aspect d'un enduit blanc mat, plutôt cireux. Sur bouillon, la croissance montre un trouble uniforme avec des ondes moirées en agitant.

La *gélatine* est liquéfiée, la liquéfaction est déjà très forte au bout de vingt-quatre heures.

La *gélose glucosée* au rouge neutre vire au jaune au bout de soixante-douze heures et présente la fluorescence accompagnée de quelques bulles de gaz ; la fluorescence et la formation de gaz s'accroissent du reste avec le temps (jusqu'au quinzième jour).

Sur la *pomme de terre*, la croissance est sous forme d'un enduit blanc et terne sans pigmentation apparente.

Sur le *sérum coagulé* et le milieu de *Loeffler*, la croissance est forte au bout de quarante-huit heures et une légère liquéfaction du milieu s'observe le quinzième jour.

Sur la *gélose sang* inclinée, une forte croissance sous forme d'un enduit blanc crémeux avec décoloration légère du milieu.

Sur la *gélose sang défibriné* de lapin en boîte de Petri, on observe nettement l'hémolyse.

Le *lait tournesolé* est digéré sans modification de teinte et la digestion est très forte au bout de cinq jours.

Le petit-lait tournesolé est décoloré complètement (soixante-douze heures) et reprend sa couleur bleue primitive le cinquième jour après l'ensemencement.

Le germe est anaérobie facultatif.

La gélose au sous-acétate de plomb reste sans modifications.

Le germe est sans action sur les glucides suivants : mannite, xylose, arabinose, lactose et galactose.

Il fermente : le maltose, le glucose, le lévulose et, tardivement, le saccharose.

Sur le milieu eau peptonée-haricot saccharosée, une pellicule sur la surface du milieu lorsque le pH de celui-ci est de 7 et un anneau lorsque le pH est de 6. Croissance plus forte à pH 6.

La catalase est produite, bien qu'elle ne soit pas abondante.

L'acétylméthylcarbinol est formé. Les nitrites sont formés à partir des nitrates.

Les caractères du *B. sotto* que nous avons rapportés ci-dessus sont différents de ceux donnés par Paillot (1928), puis ensuite par Vicher (1928) pour ce qu'ils ont appelé *Bacillus sotto* français [9, 15].

La description de Paillot, du reste très sommaire, est difficile à retenir, celle de Vicher, plus complète, ne permet pas de considérer la souche japonaise de *B. sotto* telle que nous la décrivons comme étant identique à cette « souche française ».

En effet, d'après cet auteur, ce bacille aurait de $5\ \mu$ à $8\ \mu \times 1\ \mu$, présente une liquéfaction lente de la gélatine. Il fermente le glucose et est sans action sur le maltose, mannite, saccharose et lévulose. Il reste donc à préciser en présence de quelle forme bacillaire se trouvait cet auteur, mais il ne s'agissait certainement pas du *B. sotto* dont nous avons donné la description.

Bacillus thuringensis Berliner
(souche d'origine allemande reçue des Etats-Unis).

Les éléments isolés de ce bacille qui apparaît en culture sur gélose de vingt-quatre heures sous forme de longs filaments et de chaînettes, mesurent individuellement de 2,5 à 6 μ en longueur sur 1 μ de largeur, ou un peu plus. Les spores sont centrales ou subterminales.

La première de ces souches ressemble, « grosso modo », au *Bacillus sotto*, avec cette différence qu'elle pousse sur bouillon, formant un voile, ne fait virer que légèrement la gélose glucosée au rouge neutre, *mais sans production de gaz*, digère le lait avec changement de couleur du tournesol qui devient mauve rosé ; modifie la couleur du petit-lait qui devient bleu très clair dans la partie supérieure du tube ensemencé ; elle présente la catalase et pousse sur la pomme de terre sans former de pigment.

Elle a la même action que *B. sotto* sur les sucres, la gélose au sous-acétate de plomb, le sérum coagulé, sur la gélatine, et forme l'acétylméthylcarbinol et l'indol ; ce dernier n'est pas formé par *B. sotto*.

Sur le milieu *eau peptonée-haricot saccharosée*, croissance sous forme d'un trouble uniforme à peu près identique aux pH 6 et 7.

Forte croissance sur le milieu gélose-sang et hémolyse très nette sur le milieu au sang frais et défibriné de lapin.

Sur le milieu minéral de Grelet, croissance à peine visible.

Bacillus thuringensis [souche de France] (2).

La seconde souche, celle de Metalnikov et Chorine, présente aussi des affinités avec *B. sotto*. Cette souche atteste dans l'ensemble des caractères semblables à ceux de *Bacillus sotto*.

Ce bacille apparaît dans les cultures de vingt-quatre heures sur gélose ordinaire sous forme de filaments longs et enchevêtrés. Les éléments isolés formant les chaînettes sont relativement courts et atteignent de 1 à 4 μ \times 1 μ de diamètre. Les spores mesurent de 1 à 1,5 μ . La sporulation sur gélose ordinaire ne commence que quarante-huit heures après l'ensemencement.

La croissance sur gélose ordinaire et bouillon ordinaire a le même aspect que celle du *B. sotto* ou du *thuringensis* type. La gélatine est cependant lentement liquéfiée, mais la liquéfaction est totale vers le quatrième jour. La gélose glucosée au rouge neutre ne subit aucune modification et la croissance sur ce milieu est faible ; sur pomme de terre, le germe pousse sous l'aspect d'un enduit blanc, mat et épais, sans aucune pigmentation.

Le bacille décolore le petit-lait tournesolé ; le lait tournesolé est peptonisé et la couleur, au début bleue, vire au mauve ; la digestion est cependant lente.

(2) La souche de *Bacillus thuringensis*, d'origine française, provenait de la collection de l'Institut Pasteur de Paris.

La souche d'origine allemande nous a été très aimablement adressée par le professeur Steinhaus et il s'agit de la souche dont il a démontré la virulence pour les chenilles de la « coliaide de luzerne » dans les conditions expérimentales et dans la nature [13].

Cette souche de *thuringensis* attaque légèrement le sérum coagulé qui est liquéfié, quoique faiblement, au bout de dix à quinze jours de culture.

Le *thuringensis* de Metalnikov fermente, comme *B. sotto* et *thuringensis* des Etats-Unis, les glucides suivants : glucose, maltose, lévulose et saccharose, et est sans action sur : mannite, galactose, lactose, arabinose et xylose.

Sur le milieu eau peptonée-haricot saccharosée, forte croissance à pH 7 et faible à pH 6. Une bonne croissance sur gélose au sang ; une hémolyse nette.

Sur le milieu minéral de Grelet, le bacille pousse faiblement, mais forme néanmoins des spores en quantité plus grande que toutes les autres souches étudiées.

Le bacille produit l'acétylméthylcarbinol et forme, comme la souche des Etats-Unis, de l'indol.

D'après la description de Chorine, la souche étudiée par lui ne formait pas d'indol.

Il ressort des faits exposés que *B. sotto* (Ishiwata), le bacille pathogène pour les vers à soie au Japon, qui fut étudié tout spécialement par Aoki et Chigasaki, mais dont l'identité ne fut pas établie, jusqu'ici, d'une manière certaine, devrait être considéré non pas comme faisant partie du groupe de *B. megatherium*, mais de celui de *B. cereus* Frankland et Frankland. Cette espèce s'apparente, d'autre part, au *B. thuringensis* Berliner, dont les souches provenant de France et d'Allemagne sont, à quelques détails près, identiques. Il se trouve aussi qu'à la liste d'espèces du genre *Bacillus* pathogènes pour les insectes, s'ajoute, avec *B. cereus* var. *alesti* étudiée antérieurement (Toumanoff et Vago) [14], encore une entité microbienne — appartenant au groupe de *B. cereus* — qui compte ainsi le plus grand nombre d'espèces entomophytes pathogènes pour les insectes.

La similitude de ces souches du point de vue biochimique nous incite à penser qu'on doit les désigner non pas comme des espèces bactériennes spéciales, mais comme des variétés de *B. cereus* Frankland et Frankland. Les dénominations : *Bacillus cereus* var. *sotto* et *Bacillus cereus* var. *thuringensis* nous paraissent ainsi plus justifiées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. AOKI et Y. CHIGASAKI. *Mitt. der Med. Fakultät der Kaiserlichen Universität zu Tokyo*, 1915, **13**, 3.
- [2] A. AOKI et Y. CHIGASAKI. *Bull. Imperial Sericicultural Experiment Station*, near Nakano, Tokio, 1916, vol. 1.
- [3] E. BERLINER. *Zeitschr. Angew. Ent.*, 1915, **2**, 29-56.
- [4] V. CHORINE. *Internat. Corn. Borer Invest. Sci. Rpts*, 1929, **2**, 39-53.
- [5] T. ELLINGER et V. CHORINE. *Internat. Corn. Borer Invest., Sci. Rpts.*, 1930, **3**, 37-38.
- [6] B. HUSZ. *Internat. Corn. Borer Invest., Sci. Rpts*, 1928, **1**, 191-193.
- [7] O. MATTES. *Gessel Beförd. Gesam. Naturw. Stbber. Marburg*, 1927, **62**, 381-417.
- [8] S. METALNIKOV et V. CHORINE. *Internat. Corn. Borer Invest. Sci. Rpts.*, 1929, **2**, 54-59. — a) *Idem*, 1929, **2**, 60-61. — b) *Ces Annales*, 1929, **43**, 1391-1395.

- [9] PAILLOT. Les maladies du ver à soie. *Editions du Service Photographique de l'Université de Lyon*, 1928.
- [10] N. R. SMITH, E. E. GORDON et F. E. CLARK. *U. S. Dept. Agr. Misc. Pub.*, 1946, 559.
- [11] E. STEINHAUS. *Insect Microbiology. Comstock Publ. Co., Inc. Ithaca*, 1946, 763 pages.
- [12] E. STEINHAUS. *Principles of Insect Pathology, Mc. Graw-Hill Book Co. Inc. New-York*, 1949, 757 pages.
- [13] E. STEINHAUS. *Hilgardia*, 1951, 20, n° 18.
- [14] C. TOUMANOFF et C. VAGO. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, 233, 1504-1506.
- [15] M. VICHER. Contribution à l'étude de l'immunité chez l'insecte. Thèse Montpellier. Impr. F. Montane, 1928.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Recherches sur le diagnostic sérologique des oreillons.
II. Inhibition de l'hémagglutination, par R. SOHIER et I. TRIMBERGER-ESSER.

La parasitémie au cours du paludisme expérimental du Rat blanc par *Plasmodium berghei*, par G. FABIANI, P. GRELLET, R. VARGUES, G. FULCHIRON et M^{me} A. VERAIN.

Recherches sur la protéolyse bactérienne aérobie au sein du sol, par J. POCHON et M^{lle} M.-A. CHALVIGNAC.

Diminution de l'agglutinabilité Vi des bacilles typhiques après fixation des bactériophages spécifiques de l'antigène Vi, par E. EDLINGER et Pierre NICOLLE.

Sur la teneur en « complexe lipidique périphérique » des bacilles acido-alcoolo-résistants. Notion de cycle vital lipidique de ces germes, par J. DESBORDES et Et. FOURNIER.

Le Gérant : G. MASSON.